



Caja 683

# Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda

Nov  
PGF

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-105928-A-00000-0000

Fecha: 2003-12-02 14:02:08 Dep. 2020 DIR NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASE NACIONAL II  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

PCT

SOLICITUD

## PATENTE DE INVENCION

03-105928-A

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

DERIVADOS DE BIPEPTIDO QUE TIENE UN GRUPO 2-TIOACILO N-TERMINAL  
COMO INHIBIDORES DE VASOPEPTIDASA. DIVISIONAL 1

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 5/06

71. SOLICITANTE

NOVARTIS AG.

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

75

PCV

**FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES**

**SOLICITUD DE :**

1

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Registro de diseño Industrial

☐

Esquema de Trazado para Circuitos Integrados.

2

**SOLICITANTE**

Nombre: NOVARTIS AG.

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056  
Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza  
Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono:

Fax:

E-mail:

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO  
(74)**

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 39.779.452 T.P.68.228

4.

**CONVERSIÓN**

Expediente No. \_\_\_\_\_

De: \_\_\_\_\_

A: \_\_\_\_\_

5.

**DIVISIÓN**

Expediente No. 03-105.928

No. De divisionales: 1

6.

**FUSIÓN**

Expediente No. \_\_\_\_\_

Expediente No. \_\_\_\_\_

7 Comprobante de pago No. En contestación auto

Fecha \_\_\_\_\_

**8 Anexos:**

- ☐ Comprobante de pago de la tasa
- ☒ Poderes, si fuere el caso Protocolo No. 17.398
- ☒ Certificado de existencia y representación legal, si fuere el caso
- ☐ Documento que acrediten el legítimo interés, si fuere el caso

9

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA:

  
C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68228

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

**SOLICITUD DE:**



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

**SOLICITANTE  
(71)**

Nombre: **NOVARTIS AG**

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea,  
Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza

Lugar de Constitución : Suiza

Teléfono: 41613241111 Fax: 41613227532

E-mail

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

**3  
REPRESENTANTE  
O APODERADO  
(74)**

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.779.452T.P 68228

**4**

**INVENTOR (ES)  
(72)**

Nombre: **FINK, Cynthia Anne**

Dirección: 1 Kensington Court, Lebanon, New Jersey 08833, Estados Unidos

Nacionalidad o domicilio: Lebanon, New Jersey, Estados Unidos de América

**5**

**PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2002/05293 Fecha 14 de mayo de 2002

Publicación Internacional No. WO 2002/092622 A3 Fecha 21 de noviembre de 2002

**6 TÍTULO (54)**

DERIVADOS DE DIPEPTIDO QUE TIENEN UN GRUPO 2-TIOACILO  
N-TERMINAL COMO INHIBIDORES DE VASOPEPTIDASA.

**7**

**Clasificación Internacional (51)**

C07K 5/06

**8**

**Prioridad**

SI



NO



(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

15 de mayo de 2001

11 de diciembre de 2001

(31) Número de Solicitud

60/291.088

60/339.575

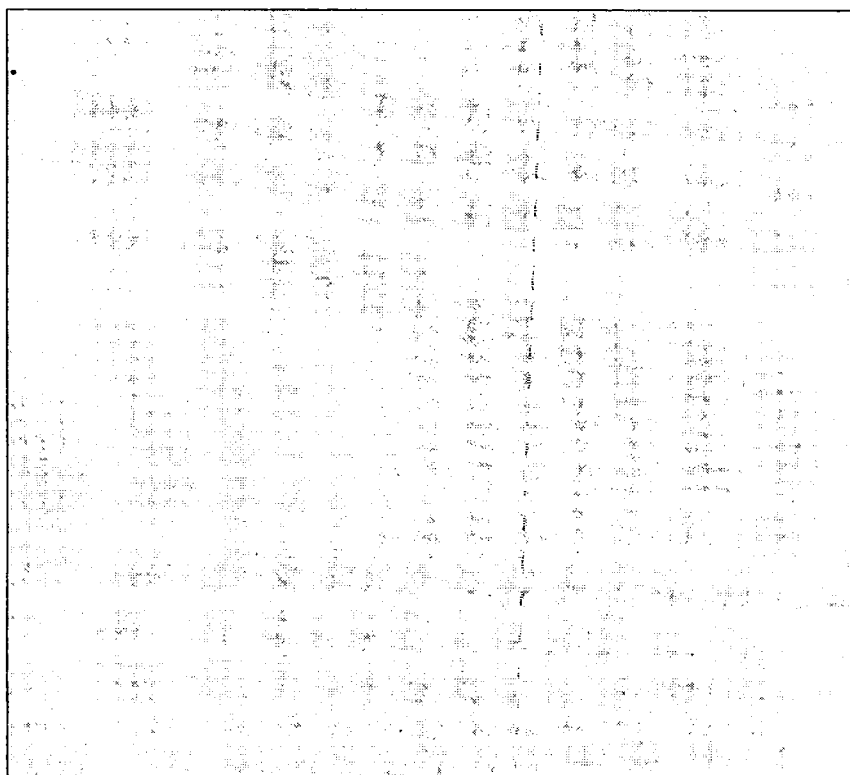
**9**

**Comprobante de pago No.** 08 - 26.949

**Fecha** 3 de abril de 2008

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso \* *Protocolo No. 17.398.*
- ☐ 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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros \* *Copia de la Opinión escrita y su traducción.*

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA



## 12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

*As. 2610/PCT Bis 1*

C.C. 39.779.452 de Usaquén

T.P. 68.228

226  
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 26.949  
FECHA : ABRIL 3 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
No. 03-105928- -00009-0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
No. 03-105928- -00009-0000

Fecha: 2008-04-10 16:18:53 Dep 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 153

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| CLARKE MODET Y CO. COLOMB | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 686700   | 03/04/2008 | 35,124,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO    | TOTAL CONCEPTO                      |
|-------|-------------|-------------|-------------------------------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN |
|       |             |             | TOTAL : \$ 501,000.00               |

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

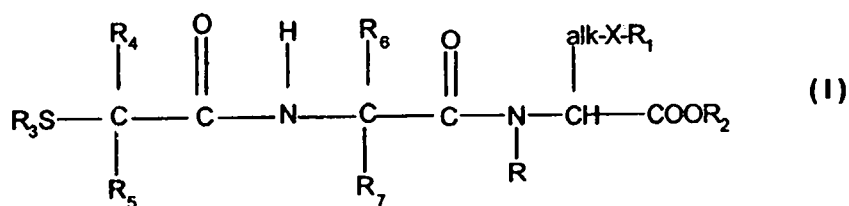
RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

2610

227  
4RESUMEN

Compuestos de la fórmula:



en donde R, R<sub>1</sub>, COOR<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>-R<sub>7</sub>, alk, y X tienen los significados como se definen, siendo éstos útiles como inhibidores dobles de la enzima convertidora de angiotensina y de la endopeptidasa neutra, así como inhibidores de la enzima convertidora de endotelina. En una modalidad preferida R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa bencilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, acetilo o metoxiacetilo; R<sub>4</sub> representa isopropilo o butilo terciario; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o etoxicarbonilo

\* \* \* \* \*

DERIVADOS DE DIPEPTIDO QUE TIENEN UN GRUPO 2-TIOACILON-TERMINAL COMO INHIBIDORES DE VASOPEPTIDASACompendio de la Invención

5           La presente invención se refiere a novedosos  
inhibidores de vasopectidasa descritos más adelante, que son  
útiles como inhibidores dobles tanto de la enzima convertidora  
de angiotensina (ACE) como de la endopeptidasa neutra (NEP, EC  
3.4.24.11). Los compuestos de la invención son particularmente  
10   útiles para el tratamiento y/o la prevención de condiciones que  
responden a la inhibición de ACE y NEP, en particular  
desórdenes cardiovasculares, tales como hipertensión,  
hipertensión sistólica aislada, insuficiencia renal (incluyendo  
edema y retención de sal), edema pulmonar, hipertrofia  
15   ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca (incluyendo  
insuficiencia cardíaca congestiva), y aterosclerosis. Los  
compuestos de la invención también son útiles para reducir los  
niveles elevados de colesterol en plasma en mamíferos. Además,  
también inhiben la enzima convertidora de endotelina (ECE), y  
20   son útiles para el tratamiento y/o la prevención de condiciones  
que respondan a la inhibición de ECE.

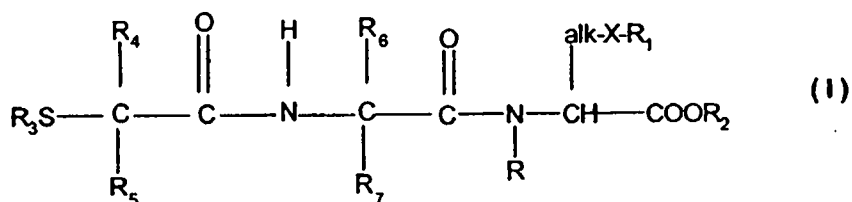
En virtud de su inhibición de la endopeptidasa  
neutra, los compuestos de la invención también pueden ser  
útiles para el tratamiento de dolor, depresión, ciertas  
25   condiciones psicóticas, y desórdenes cognoscitivos. Otras

indicaciones potenciales incluyen el tratamiento de angina, síndrome premenstrual, enfermedad de Meniere, hiperaldosteronismo, hipercalciuria, ascitas, glaucoma, asma, y desórdenes gastrointestinales tales como diarrea, síndrome de  
5 intestino irritable, e hiperacidez gástrica.

En virtud de su inhibición de ECE, los compuestos de la invención también pueden ser útiles para el tratamiento y/o prevención de condiciones y enfermedades dependientes de endotelina, incluyendo isquemia cerebral (embolia), hemorragia  
10 subaracnoidea, lesión cerebral traumática, vasoespismo cerebral, hipertrofia arterial, restenosis, enfermedad de Raynaud, infarto del miocardio, obesidad; también hiperplasia de próstata, migraña, diabetes melitus (nefropatía diabética), pre-eclamsia, glaucoma, y rechazo de trasplante tal como en el  
15 trasplante de aorta o de órganos sólidos; así como disfunción eréctil.

### Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se refiere a compuestos de la  
20 fórmula I:



en donde:

R representa hidrógeno, alquilo inferior, arilalquilo inferior carbocíclico o heterocíclico, o cicloalquilalquilo inferior;

5             $R_1$  representa alquilo inferior, cicloalquilo, arilo carbocíclico o heterocíclico, o biarilo; ó  $R_1$  representa (cicloalquilo, arilo carbocíclico, arilo heterocíclico, o biarilo)-alquilo inferior;

alk representa alquilenos inferior;

10            $R_3$  representa hidrógeno o acilo;

$R_4$  representa hidrógeno, alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo carbocíclico o heterocíclico, (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo inferior, cicloalquilo, cicloalquilalquilo inferior, biarilo, 15 biarilalquilo inferior, oxacicloalquilo, tiacicloalquilo, azacicloalquilo, u (oxacicloalquilo, tiacicloalquilo, o azacicloalquilo)-alquilo inferior;

$R_5$  representa hidrógeno o alquilo inferior; ó

$R_4$  y  $R_5$ , junto con el átomo de carbono con el que 20 están unidos, representan cicloalquilideno, cicloalquilideno benzo-fusionado; u (oxacicloalquilideno, tiacicloalquilideno, o azacicloalquilideno) de 5 ó 6 miembros, cada uno opcionalmente sustituido por alquilo inferior o arilalquilo inferior;

$R_6$  representa alquilo inferior, arilo carbocíclico o 25 heterocíclico, (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo

inferior, cicloalquilo, cicloalquilalquilo inferior, biarilo, o biarilalquilo inferior;

$R_7$  representa alquilo inferior, (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo inferior, cicloalquilalquilo inferior, o  
5 biarilalquilo inferior; o

$R_6$  y  $R_7$ , junto con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 3 a 10 miembros que puede estar sustituido por alquilo inferior o arilalquilo inferior, o que puede estar fusionado con un anillo  
10 carbocíclico de 5 a 7 miembros, saturado o insaturado; u (oxacicloalquilideno, tiacicloalquilideno, o azacicloalquilideno) de 5 ó 6 miembros, cada uno opcionalmente sustituido por alquilo inferior o arilalquilo inferior; o 2,2,2-norbornilideno;

15 X representa -O-,  $-S(O)_n-$ ,  $-NHSO_2-$ ,  $-NHCO-$ ;

n es cero, uno o dos; y

$COOR_2$  representa carboxilo o carboxilo derivado en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable;

derivados de disulfuro que se derivan a partir de  
20 dichos compuestos, en donde  $R_3$  es hidrógeno; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos; a métodos para la preparación de estos compuestos; a  
25 intermediarios; y a métodos para el tratamiento de desórdenes

en mamíferos que respondan a la inhibición de ACE y NEP, mediante la administración de estos compuestos a los mamíferos que necesiten dicho tratamiento.

La presente invención también abarca cualesquiera  
5 derivados de profármaco de los compuestos de la invención que tengan un grupo carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo libre, pudiéndose convertir estos derivados de profármaco mediante solvólisis o bajo condiciones fisiológicas para ser compuestos de carboxilo, sulfhidrilo, y/o hidroxilo libres. Los derivados  
10 de profármaco son, por ejemplo, los ésteres de los ácidos carboxílicos libres, y los derivados S-acílicos y O-acílicos de tioles, alcoholes, o fenoles, en donde acilo tenga el significado definido en la presente.

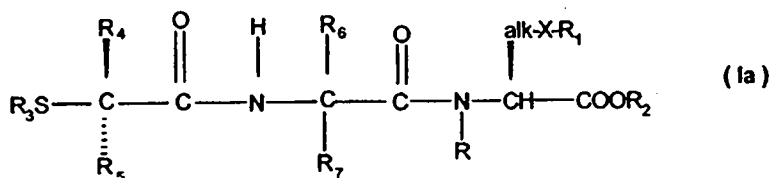
Los ésteres farmacéuticamente aceptables de  
15 preferencia son derivados de éster de profármaco, tales como se pueden convertir mediante solvólisis o bajo condiciones fisiológicas hasta los ácidos carboxílicos libres de la fórmula I.

Los ésteres de profármaco farmacéuticamente  
20 aceptables son de preferencia, por ejemplo, alquilésteres inferiores, arilalquilésteres inferiores,  $\alpha$ -(alcanoiloxilo inferior)-alquilésteres inferiores tales como el pivaloiloximetiléster, y  $\alpha$ -(alcoxicarbonilo inferior, morfolinocarbonilo, piperidinocarbonilo, pirrolidinocarbonilo,  
25 o dialquilaminocarbonilo inferior)-alquilésteres inferiores.

Las sales farmacéuticamente aceptables son las sales derivadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables para cualesquiera compuestos ácidos de la invención, por ejemplo aquéllos en donde  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo. Estas son, por ejemplo, sales de metales alcalinos (por ejemplo sales de sodio o potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de magnesio o de calcio), sales de amina (por ejemplo, sales de trometamina).

Los compuestos de la fórmula I, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes, poseen dos o más átomos de carbono asimétricos. Los diastereómeros y antípodas ópticos resultantes están abarcados por la presente invención. La configuración preferida se indica en la Fórmula Ia.

15



en donde los átomos de carbono asimétricos que llevan los sustituyentes  $-\text{alk-X-R}_1$  y  $\text{R}_4$ , normalmente tienen la configuración S.

Se prefieren los compuestos de la fórmula I y Ia en donde R y  $\text{R}_5$  representan hidrógeno;  $\text{R}_1$  representa alquilo inferior, cicloalquilo de 5 ó 6 átomos de carbono, arilo carbocíclico o heterocíclico, o (arilo carbocíclico o

heterocíclico)-alquilo inferior; alk representa alquileno inferior; X representa -O- ó -S(O)<sub>n</sub>, en donde n representa cero o dos; R<sub>3</sub> representa hidrógeno o acilo; R<sub>4</sub> representa alquilo inferior opcionalmente sustituido, oxacicloalquilo, oxacicloalquilalquilo inferior, o (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo inferior; R<sub>5</sub> representa hidrógeno; o R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, combinados con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 átomos de carbono; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan alquilo inferior; o R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, junto con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, o carboxilo derivado en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable; derivados de disulfuro que se derivan a partir de dichos compuestos, en donde R<sub>3</sub> es hidrógeno; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Además se prefieren los compuestos de la fórmula I y Ia en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico o heterocíclico o (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo inferior; R<sub>3</sub> representa hidrógeno o alcanoílo inferior opcionalmente sustituido; R<sub>4</sub> representa alquilo inferior, cicloalquilo, tetrahidropiraniilo, o alcoxiilo inferior de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo inferior; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo inferior,

(dialquilaminocarbonilo inferior)-alcoxicarbonilo inferior, o (morfolinocarbonilo, piperidinocarbonilo, o pirrolidinocarbonilo)-alcoxicarbonilo inferior; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 Se prefieren en particular los compuestos de la fórmula I ó Ia en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico o arilo carbocíclico-alquilo inferior, en donde arilo carbocíclico representa fenilo, o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo  
10 inferior, alquilo inferior, alcoxilo inferior, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, alcanoílo inferior, o alcanoílo inferior sustituido por alcoxilo inferior; R<sub>4</sub> representa alquilo inferior, 4-tetrahidropiranilo, o alcoxilo inferior de 1 a 4 átomos de  
15 carbono-alquilo inferior de 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno o etileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o alcoxicarbonilo inferior; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una modalidad se refiere a los compuestos en donde R<sub>3</sub>  
20 representa hidrógeno o alcanoílo inferior.

Además se prefieren los compuestos anteriores de la fórmula I ó Ia en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo, fluorofenilo, bencilo, o fluorobencilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, alcanoílo inferior, o alcanoílo inferior  
25 sustituido por alcoxilo inferior; R<sub>4</sub> representa isopropilo,

butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o alcoxycarbonilo inferior; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 Una modalidad se refiere a los compuestos en donde R<sub>3</sub> representa hidrógeno o alcanóilo inferior.

Las modalidades particulares preferidas se refieren a compuestos de la fórmula I ó Ia en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, 10 acetilo, o metoxiacetilo; R<sub>4</sub> representa isopropilo o butilo terciario; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o etoxycarbonilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 Las definiciones como tales o en combinación, como se utilizan en la presente, a menos que se indique de otra manera, tienen los siguientes significados dentro del alcance de la presente invención.

Arilo representa arilo carbocíclico o heterocíclico, 20 ya sea monocíclico o bicíclico.

Arilo carbocíclico monocíclico representa fenilo opcionalmente sustituido, siendo de preferencia fenilo, o fenilo sustituido por uno a tres sustituyentes, siendo estos convenientemente alquilo inferior, hidroxilo, alcoxilo 25 inferior, aciloxilo, halógeno, ciano, trifluorometilo,

trifluorometoxilo, amino, alcanoilamino inferior, alquilo inferior-(tio, sulfinilo, o sulfonilo), alcoxycarbonilo inferior, mono- ó di-alquilcarbamoilo inferior, o mono- ó di-alquilamino inferior; o fenilo sustituido por alquilendioxilo inferior.

Arilo carbocíclico bicíclico representa 1- ó 2-naftilo, o 1- ó 2-naftilo de preferencia sustituido por alquilo inferior, alcoxilo inferior, o halógeno.

Arilo heterocíclico monocíclico representa de preferencia tiazolilo opcionalmente sustituido, pirimidilo, triazolilo, tienilo, furanilo, o piridilo.

Furanilo opcionalmente sustituido representa 2- ó 3-furanilo, 2- ó 3-furanilo de preferencia sustituido por alquilo inferior.

Piridilo opcionalmente sustituido representa 2-, 3-, ó 4-piridilo, 2-, 3-, ó 4-piridilo de preferencia sustituido por alquilo inferior, halógeno, o ciano.

Tienilo opcionalmente sustituido representa 2- ó 3-tienilo, ó 2-, ó 3-tienilo de preferencia sustituido por alquilo inferior.

Pirimidilo opcionalmente sustituido representa, por ejemplo, 2-pirimidilo, ó 2-pirimidilo sustituido por alquilo inferior.

Tiazolilo opcionalmente sustituido representa, por ejemplo, 2-tiazolilo, ó 2-tiazolilo sustituido por alquilo

inferior.

Triazolilo opcionalmente sustituido representa, por ejemplo, 1,2,4-triazolilo, ó 1,2,4-triazolilo de preferencia sustituido por alquilo inferior.

5 Arilo heterocíclico bicíclico representa de preferencia indolilo, benzotiazolilo, quinolinilo, o isoquinolinilo opcionalmente sustituido por hidroxilo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, o halógeno, de una manera conveniente 3-indolilo, 2-benzotiazolilo, ó 2- ó 4-quinolinilo.

10 Arilo como en arilalquilo inferior, de preferencia es fenilo, o fenilo sustituido por uno o dos de alquilo inferior, alcoxilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, halógeno, trifluorometilo, ciano, alcanoilamino inferior, o alcoxycarbonilo inferior; también, naftilo opcionalmente  
15 sustituido.

Arilalquilo inferior convenientemente es bencilo, ó 1- ó 2-fenetilo opcionalmente sustituido sobre el fenilo por uno o dos de alquilo inferior, alcoxilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, halógeno, o trifluorometilo.

20 El término "inferior" referido en la presente en relación con los radicales o compuestos orgánicos, define respectivamente éstos con hasta e incluyendo 7, de preferencia hasta e incluyendo 4, y conveniente 1 ó 2 átomos de carbono. Estos pueden ser de cadena recta o ramificada.

25 Alquilo inferior opcionalmente sustituido se refiere

a alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, por ejemplo, por halógeno, hidroxilo, alcoxilo inferior, amino, (mono- ó di-alquilo inferior)-amino, acilamino, 1-alquilo inferior-piperazino, morfolino, piperidino, pirrolidino, y similares.

5           Alquilenos inferiores se refieren a una cadena de carbono recta o ramificada que tiene de preferencia de 1 a 4 átomos de carbono, que puede estar sustituida, por ejemplo por alcoxilo inferior, por ejemplo  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , y similares.

Un grupo alquilo inferior de preferencia contiene de  
10 1 a 4 átomos de carbono, que puede ser de cadena o ramificada, y representa, por ejemplo, etilo, propilo, butilo, o convenientemente metilo.

Un grupo alcoxilo inferior de preferencia contiene de  
1 a 4 átomos de carbono, que puede ser de cadena recta o  
15 ramificada, y representa, por ejemplo, metoxilo, propoxilo, isopropoxilo, o convenientemente etoxilo.

Cicloalquilo representa un radical de hidrocarburo cíclico saturado que de preferencia contiene de 5 a 7 átomos de carbono del anillo, de preferencia ciclopentilo o ciclohexilo.

20           Oxacicloalquilo representa de preferencia oxacicloalquilo de 5 a 7 miembros, por ejemplo tetrahidropiraniolo, tal como 4-tetrahidropiraniolo.

Tiacicloalquilo representa de preferencia tiacicloalquilo de 5 a 7 miembros, por ejemplo  
25 tetrahidrotiopiraniolo, tal como 4-tetrahidrotiopiraniolo.

Azacicloalquilo representa de preferencia azacicloalquilo de 5 a 7 miembros, por ejemplo pirrolidinilo o piperidinilo, en donde el átomo de nitrógeno puede estar sustituido por alquilo inferior o por arilalquilo inferior.

5 El término "cicloalquilalquilo inferior" representa de preferencia (ciclopentil ó ciclohexil)-metilo, 1- ó 2-(ciclopentil ó ciclohexil)etilo, 1-, 2-, ó 3-(ciclopentil ó ciclohexil)propilo, ó 1-, 2-, 3-, ó 4-(ciclopentil ó ciclohexil)-butilo. De una manera similar, (oxaciclil, 10 tiacicicloalquil, o azacicloalquil)-alquilo inferior.

Un grupo alcoxycarbonilo inferior de preferencia contiene de 1 a 4 átomos de carbono en la porción de alcoxilo, y representa, por ejemplo, metoxycarbonilo, propoxycarbonilo, isopropoxycarbonilo, o convenientemente etoxycarbonilo.

15 Cicloalquilideno es de 3 a 10 miembros, de preferencia de 5 ó 6 miembros, y representa un grupo de enlace de cicloalcano en donde los dos grupos unidos están unidos al mismo átomo de carbono del anillo de cicloalcano.

Oxacicloalquilideno de 5 ó 6 miembros representa un 20 grupo de enlace de tetrahidrofurano o tetrahidropirano, es decir, tetrahidrofuranilideno o tetrahidropiranilideno, en donde los dos grupos unidos están unidos al mismo átomo de carbono de los anillos respectivos, por ejemplo en la posición 3 ó 4 de los mismos.

25 Tiacicicloalquilideno de 5 ó 6 miembros representa un

grupo de enlace de tetrahidrotiofeno o tetrahidrotiopirano, en donde los dos grupos unidos están unidos al mismo átomo de carbono de los anillos respectivos, en la posición 3 ó 4 de los mismos.

5           Azaciccloalquilideno de 5 ó 6 miembros representa un grupo de enlace de pirrolidina o piperidina, en donde los dos grupos unidos están unidos al mismo átomo de carbono de los anillos respectivos, por ejemplo en la posición 3 ó 4 de los mismos, y el átomo de nitrógeno puede estar sustituido por  
10 alquilo inferior, por ejemplo metilo, o por arilalquilo inferior, por ejemplo bencilo.

Cicloalquilideno benzo-fusionado representa, por ejemplo, 1,1- ó 2,2-tetralinilideno, ó 1,1- ó 2,2-indanilideno.

Halógeno (halo) de preferencia representa flúor o  
15 cloro, pero también puede ser bromo o yodo.

Acilo se deriva a partir de un ácido carboxílico, y representa de preferencia alcanóilo inferior opcionalmente sustituido, arilo carbocíclico-alcanóilo inferior, aroílo, alcoxycarbonilo inferior, o arilalcoxycarbonilo inferior, de  
20 una manera conveniente alcanóilo inferior opcionalmente sustituido, o aroílo.

Alcanóilo inferior es de preferencia acetilo, propionilo, butirilo, o pivaloílo.

Alcanóilo inferior opcionalmente sustituido, por  
25 ejemplo, representa alcanóilo inferior, o alcanóilo inferior

sustituido, por ejemplo, por alcoxycarbonilo inferior, alcanoiloxilo inferior, tioalcanoílo inferior, alcoxilo inferior, tioalquilo inferior, hidroxilo, dialquilamino inferior, alcanoilamino inferior, morfolino, piperidino, 5 pirrolidino, 1-alquilo inferior-piperazino, arilo, o heteroarilo.

Aroílo es aroílo carbocíclico o heterocíclico, de preferencia aroílo carbocíclico monocíclico ó heterocíclico monocíclico.

10 Aroílo carbocíclico monocíclico es de preferencia benzoílo, o benzoílo sustituido por alquilo inferior, alcoxilo inferior, halógeno, o trifluorometilo.

Aroílo heterocíclico monocíclico es de preferencia piridilcarbonilo o tienilcarbonilo.

15 Aciloxilo es de preferencia alcanoiloxilo inferior opcionalmente sustituido, alcoxycarboniloxilo inferior, aroiloxilo carbocíclico monocíclico, o aroiloxilo heterocíclico monocíclico.

20 Arilalcoxycarbonilo inferior es de preferencia alcoxycarbonilo inferior carbocíclico monocíclico, convenientemente benciloxycarbonilo.

Biarilo representa arilo monocarbocíclico sustituido por arilo carbocíclico monocíclico o heterocíclico monocíclico, y de preferencia representa bifenililo, convenientemente 4- 25 bifenililo opcionalmente sustituido sobre uno o ambos anillos

de benceno por alquilo inferior, alcoxilo inferior, halógeno, o trifluorometilo.

Biarilalquilo inferior es de preferencia 4-bifenililalquilo inferior, convenientemente 4-bifenilil-metilo.

5 Los compuestos novedosos de la invención son inhibidores de ACE, que inhiben la conversión de la angiotensina I hasta la sustancia presora angiotensina II, y por lo tanto, reducen la presión sanguínea en los mamíferos. Además, los compuestos de la invención demuestran la inhibición  
10 de NEP, y por consiguiente, potencian los efectos cardiovasculares (por ejemplo, diuréticos y natriuréticos) de los factores natriuréticos auriculares (ANF). El efecto combinado es benéfico para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares en mamíferos, en particular hipertensión,  
15 condiciones cardíacas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, e insuficiencia renal. Un efecto benéfico adicional de los compuestos de la invención en el tratamiento de estos desórdenes cardiovasculares, es la inhibición de ECE.

Las propiedades anteriormente mencionadas se pueden  
20 demostrar en pruebas *in vitro* e *in vivo*, utilizando convenientemente mamíferos, por ejemplo ratones, ratas, perros, monos, u órganos aislados, tejidos, y preparaciones de los mismos. Estos compuestos se pueden aplicar *in vitro* en la forma de soluciones, por ejemplo de preferencia soluciones acuosas, e  
25 *in vivo*, ya sea enteralmente, parenteralmente, de una manera

conveniente oralmente (PO), o intravenosamente (i.v.), por ejemplo como una suspensión o en una solución acuosa. La dosificación *in vitro* puede ser de concentraciones de entre aproximadamente  $10^{-6}$  molar y  $10^{-9}$  molar. La dosificación *in vivo* puede ser, dependiendo de la vía de administración, de entre aproximadamente 0.01 y 50 miligramos/kilogramo, convenientemente entre aproximadamente 0.1 y 25 miligramos/kilogramo.

La prueba *in vitro* es más apropiada para los ácidos carboxílicos libres de la invención. El compuesto de prueba se disuelve en sulfóxido de dimetilo, etanol, o una solución de bicarbonato de sodio 0.25 M, y la solución se diluye con el regulador hasta la concentración deseada.

La inhibición *in vitro* de ACE mediante los compuestos de esta invención se puede demostrar mediante un método análogo al que se da en Biochem. Pharmacol. Volumen 20, página 1637 (1971). El regulador para el ensayo de ACE es NaCl 300 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM (pH de 8.3). La reacción se inicia mediante la adición de 100 microlitros de hipuril-histidil-leucina (2 miligramos/mililitro) a tubos que contengan la enzima y el fármaco en un volumen de 150 microlitros, y los tubos se incuban durante 30 minutos a 37°C. La reacción se termina mediante la adición de 0.75 mililitros de NaOH 0.6N. Se agregan 100 microlitros de solución de O-ftaldheído recién preparada (2 miligramos/mililitro en metanol) a los tubos, se mezcla el

contenido, y se deja reposar a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se agregan 100 microlitros de HCl 6N. Los tubos se centrifugan, y se lee la densidad óptica del sobrenadante a 360 nanómetros. Los resultados se grafican contra la concentración del fármaco para determinar la  $IC_{50}$ , es decir, la concentración de fármaco que dé la mitad de la actividad de la muestra de control que no contenga fármaco.

Normalmente, los compuestos de la invención demuestran una  $IC_{50}$  en el rango de aproximadamente 0.1 a 50 nM para la inhibición de ACE.

Ilustrando la invención, el compuesto del Ejemplo 6(a) demuestra una  $IC_{50}$  de aproximadamente 20 nM en el ensayo de ACE *in vitro*.

La inhibición de ACE se puede demostrar *in vivo* después de su administración oral o intravenosa, midiendo la inhibición de la respuesta presora inducida por angiotensina I en ratas normotensivas.

La prueba *in vivo* para los compuestos administrados intravenosamente se realiza con ratas normotensivas machos, que estén conscientes. Se canula una arteria femoral o una vena femoral, respectivamente, para la medición directa de la presión sanguínea después de la administración intravenosa de angiotensina I, y de la administración intravenosa u oral de un compuesto de esta invención. Después de que se estabiliza la presión sanguínea basal, se obtienen las respuestas presoras a

3 ó 4 agresiones de 300 nanogramos/kilogramo de angiotensina I intravenosamente, a intervalos de 15 minutos. Estas respuestas de presión normalmente se obtienen de nuevo a los 15, 30, 60, y 90 minutos, y luego cada hora hasta 6 horas después de la 5 administración intravenosa u oral del compuesto que se vaya a probar, y se comparan con las respuestas iniciales. Cualquier reducción observada de la respuesta presora es una indicación de la inhibición de ACE.

Ilustrando la invención, el compuesto del Ejemplo 10 6(a) inhibe la respuesta presora inducida por angiotensina I durante 3 horas en una dosis de 10 miligramos/kilogramo intravenosamente. De una manera similar, el compuesto del Ejemplo 1(a) inhibe la respuesta presora inducida por angiotensina I durante 6 horas en una dosis de 11.8 15 miligramos/kilogramo oralmente.

La inhibición *in vitro* de NEP (EC 3.4.24.11) se puede determinar como sigue:

Se determina la actividad de NEP 3.4.24.11 mediante la hidrólisis del sustrato de glutaril-Ala-Ala-Phe-2-naftilamida (GAAP), utilizando un procedimiento modificado de 20 Orlowski y Wilk (1981). La mezcla de incubación (volumen total de 125 microlitros) contiene 4.2 microlitros de proteína (membranas de corteza de riñón de rata preparadas mediante el método de Maeda y colaboradores, 1983), regulador Tris 50 mM, 25 pH de 7.4, a 25°C, sustrato 500  $\mu$ M (concentración final), y

247  
24

leucina-aminopeptidasa M (2.5 microgramos). La mezcla se incubaba durante 10 minutos a 25°C, y se agregan 100 microlitros de granate rápido (250 microgramos de granate rápido/mililitro de Tween 20 al 10 por ciento en acetato de sodio 1M, pH de 4.2).

5 La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente a 540 nanómetros. Una unidad de actividad de NEP 24.11 se define como un nanomol de 2-naftilamina liberado por minuto a 25°C a un pH de 7.4. Se determinan los valores  $IC_{50}$ , es decir, la concentración del compuesto de prueba requerida para una  
10 inhibición del 50 por ciento de la liberación de 2-naftilamina.

También se puede determinar la actividad de NEP utilizando ANF como un sustrato. La actividad degradante de ANF se determina midiendo la desaparición de ANF de rata (r-ANF) utilizando una separación de HPLC de fase inversa de 3 minutos.  
15 Se incubaba previamente una alícuota de la enzima en regulador Tris-HCl 50 mM, pH de 7.4, a 37°C durante 2 minutos, y se inicia la reacción mediante la adición de 4 nanomoles de r-ANF en un volumen total de 50 microlitros. La reacción se termina después de 4 minutos con la adición de 30 microlitros de ácido  
20 trifluoroacético al 0.27 por ciento (TFA). Una unidad de actividad se define como la hidrólisis de un nanomol de r-ANF por minuto a 37°C a un pH de 7.4. Se determinan los valores  $IC_{50}$ , es decir, la concentración del compuesto de prueba requerida para una inhibición del 50 por ciento de la  
25 hidrólisis de ANF.

Normalmente, los compuestos de la invención demuestran una  $IC_{50}$  en el rango de aproximadamente 0.1 a 50 nM para la inhibición de NEP.

Ilustrando la invención, el compuesto del Ejemplo 6(a) demuestra una  $IC_{50}$  de aproximadamente 5 nM en el ensayo de GAAP *in vitro*.

El efecto de los compuestos de la invención sobre la concentración de ANF en plasma de rata se puede determinar como sigue:

Se anestesian ratas Sprague-Dawley machos (de 275 a 390 gramos) con cetamina (150 miligramos/kilogramo)/acepromacina (10 por ciento), y se instrumentan con catéteres en la arteria y vena femoral para obtener muestras de sangre e infundir ANF, respectivamente. Las ratas se sujetan con un sistema oscilatorio y se dejan recuperarse durante 24 horas antes de estudiarse en el estado consciente sin tensiones.

En el ensayo, se determinan los niveles de ANF en plasma en la presencia y en ausencia de inhibición de NEP. En el día del estudio, todas las ratas se infunden continuamente con ANF a 450 nanogramos/kilogramo/minuto intravenosamente durante las 5 horas del experimento. 60 minutos después de iniciar la infusión, se obtienen muestras de sangre para las mediciones de ANF de la línea base (tiempo cero), y luego las ratas se dividen aleatoriamente en grupos tratados con el

compuesto de prueba o con vehículo. Se toman muestras de sangre adicionales 30, 60, 120, 180, y 240 minutos después de la administración del compuesto de prueba.

Se determinan las concentraciones en plasma de ANF mediante un radioinmunoensayo específico. El plasma se diluye (x12.5, x25, y x50) en un regulador conteniendo: Tris 50 mM (pH de 6.8), NaCl 154 mM, albúmina de suero bovino al 0.3 por ciento, EDTA al 0.01 por ciento. Se agregan 100 microlitros de estándares [rANF (99-126)] o de muestras a 100 microlitros de suero anti-rANF de conejo, y se incuban a 4°C durante 16 horas. Luego se agregan 10,000 cpm de [<sup>125</sup>I]rANF a la mezcla de reacción, la cual se incuba a 4°C durante 16 horas. Entonces se agregan 10,000 cpm de [<sup>125</sup>I]rANF a la mezcla de reacción, la cual se incuba a 4°C durante 24 horas adicionales. Se agrega suero de IgG de cabra anti-conejo acoplado con partículas paramagnéticas a la mezcla de reacción, y se granula el [<sup>125</sup>I]rANF enlazado exponiendo la mezcla a una rejilla magnética de atracción. Se decanta el sobrenadante y se cuentan los gránulos en un contador gamma. Todas las determinaciones se realizan por triplicado. Los niveles de ANF en plasma se expresan como un porcentaje de aquéllos medidos en los animales tratados con vehículo que recibieron solamente ANF (450 nanogramos/kilogramo/minuto intravenosamente).

Ilustrando la invención, el compuesto del Ejemplo 1(a) incrementa los niveles de ANF en plasma por

aproximadamente el 70 por ciento en una dosis de 11.8 miligramos/kilogramo oralmente.

La actividad anti-hipertensiva se puede determinar, por ejemplo, en la rata espontáneamente hipertensa (SHR) y en la rata hipertensa por sal DOCA, por ejemplo de acuerdo con Bazil y colaboradores, J. Cardiovasc. Pharmacol. Volumen 22, páginas 897-905 (1993), y Trapani y colaboradores, J. Cardiovasc. Pharmacol. Volumen 14, páginas 419-424 (1989), respectivamente.

Ilustrando la invención, el compuesto del Ejemplo 1(a) reduce la presión arterial media en SHR conscientes con una administración una vez al día de 11.8 miligramos/kilogramo oralmente.

El efecto anti-hipertensivo se puede determinar en ratas hipertensas con sal de acetato de desoxi-corticosterona (DOCA) como sigue:

Se preparan ratas hipertensas por sal DOCA (de 280 a 380 gramos) mediante el método convencional. Las ratas se someten a una nefrectomía unilateral, y una semana después, se les implantan gránulos silásticos conteniendo 100 miligramos/kilogramo de DOCA. Las ratas se mantienen con agua para beber con el 1 por ciento de NaCl/el 0.2 por ciento de KCl durante 3 a 5 semanas, hasta que se establece la hipertensión sostenida. En este momento se evalúa la actividad anti-hipertensiva.

~~25~~  
28

Dos días antes del experimento, las ratas se anestesian con metoxifluorano, y se instrumentan con catéteres en la arteria femoral para medir la presión sanguínea arterial. 48 horas después, se registran la presión arterial de la línea base y el ritmo cardíaco durante un período de 1 hora. Entonces se administra el compuesto de prueba o el vehículo, y se monitorean los mismos parámetros cardiovasculares durante 5 horas adicionales.

La actividad diurética (salurética) se puede determinar en rastreos diuréticos estándares, por ejemplo como se describe en "New Anti-hypertensive Drugs", Spectrum Publications, páginas 307-321 (1976), o midiendo la potenciación de la natriuresis inducida por ANF y la diuresis en la rata.

La potenciación del efecto natriurético de ANF se puede determinar como sigue:

Las ratas Sprague-Dawley machos (de 280 a 360 gramos) se anestesian con Inactina (100 miligramos/kilogramo intraperitonealmente), y se instrumentan con catéteres en la arteria femoral, en la vena femoral, y en la vejiga urinaria, para medir la presión arterial, administrar ANF, y recolectar orina, respectivamente. Se mantiene una infusión continua de suero normal (33 microlitros/minuto) a través de todo el experimento para promover la diuresis y la excreción de sodio. El protocolo experimental consiste en un período de recolección

inicial de 15 minutos (designado como un pre-control), seguido por tres períodos de recolección adicionales. Inmediatamente después de terminar el período de pre-control, se administra el compuesto de prueba o el vehículo; no se hace nada durante los siguientes 45 minutos. Luego, se obtienen la presión sanguínea y las mediciones renales durante un segundo período de recolección (control designado, 15 minutos). A la conclusión de este período, se administra ANF (1 microgramo/kilogramo, bolo intravenoso) a todos los animales, y se determinan la presión arterial y los parámetros renales durante dos períodos de recolección consecutivos de 15 minutos. Se determinan la presión arterial media, el flujo de orina, y la excreción de sodio urinario para todos los períodos de recolección. La presión sanguínea se mide con un transductor de presión Gould p50, el flujo de orina se determina gravimétricamente, la concentración de sodio se mide mediante fotometría de flama, y la excreción de sodio urinario se calcula como el producto del flujo de orina y la concentración de sodio en orina.

La inhibición *in vitro* de ECE se puede determinar como sigue:

Se purifica parcialmente ECE a partir de células endoteliales aórticas primarias porcinas mediante cromatografía en columna de intercambio de aniones DE52, y se cuantifica su actividad mediante radioinmunoensayo (RIA) como se describe en Anal. Biochem. Volumen 212, página 434-436 (1993). De una

manera alternativa, la enzima nativa puede ser sustituida por una forma recombinante de ECE, como se describe, por ejemplo, en Cell, volumen 78, páginas 473-485 (1994). La ECE-1 humana ha sido descrita por varios grupos (Schmidt y colaboradores, FEBS Letters, volumen 356, páginas 238-243 (1994); Kaw y colaboradores, 4<sup>th</sup> Int. Conf. on Endothelin; 23-25 de abril, Londres (UK) (1995) C6; Valdenaire y colaboradores, J. Biol. Chem., Volumen 270, páginas 29794-29798 (1995); Shimada y colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Commun., volumen 207, páginas 807-812 (1995)). La inhibición de ECE se puede determinar como se describe en Biochem. Mol. Biol. Int., Volumen 31, Número 5, páginas 861-867 (1993), mediante RIA, para medir la ET-1 formada a partir de ET-1 grande.

De una manera alternativa, se puede utilizar la ECE-1 humana recombinante (rhECE-1) como sigue:

Se cultivan células de ovario de hámster chino que expresen rhECE-1 (Kaw y colaboradores, 4<sup>th</sup> Int. Conf. on Endothelin; 23-25 de abril, Londres (UK), (1995) C6), en un medio DMEM/F12 conteniendo suero bovino fetal al 10 por ciento y antibiótico-antimicótico 1x. Las células se cosechan raspando, se granulan mediante centrifugación, y se homogeneizan a 4°C en un regulador que contiene MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pepstatina A 1 µM, leupeptina 100 µM, PMSF 1 mM, y Tris 20 mM, pH de 7.0, con una proporción de 2 mililitros de regulador/mililitro de células. El desecho celular se remueve

mediante una breve centrifugación, y el sobrenadante se centrifuga de nuevo a 100,000 x g durante 30 minutos. El gránulo resultante se vuelve a suspender en un regulador que contenga NaCl 200 mM, y TES 50 mM, pH de 7.0, en una  
5 concentración de proteína de aproximadamente 15 miligramos/mililitro, y se almacena en alícuotas a -80°C.

Para evaluar el efecto de un inhibidor sobre la actividad de ECE-1, se incuban previamente 10 microgramos de proteína con el compuesto en una concentración deseada durante  
10 20 minutos a temperatura ambiente en TES 50 mM, pH de 7.0, y Triton X-100 al 0.005 por ciento, en un volumen de 10 microlitros. Luego se agrega ET-1 grande humana (5 microlitros) hasta una concentración final de 0.2  $\mu$ M, y la mezcla de reacción se incuba adicionalmente durante 2 horas a 37°C. La  
15 reacción se detiene mediante la adición de 500 microlitros de regulador RIA conteniendo Triton X-100 al 0.1 por ciento, albúmina de suero bovino al 0.2 por ciento, y  $\text{NaN}_3$  al 0.02 por ciento en suero regulado con fosfato.

Las muestras diluidas (200 microlitros) obtenidas del  
20 ensayo enzimático anterior se incuban a 4°C durante la noche con 25 microlitros de cada uno de [ $^{125}\text{I}$ ]ET-1 (10,000 cpm/tubo) y anticuerpos de conejo diluidos a 1:20,000 veces que reconozcan específicamente el triptófano terminal de carboxilo de ET-1. Entonces se agregan a cada tubo anticuerpos de cabra anti-  
25 conejo acoplados con perlas magnéticas (70 microgramos), y la

mezcla de reacción se incubaba adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las perlas se granulan utilizando una rejilla magnética. El sobrenadante se decanta, y se cuenta la radioactividad del gránulo en un contador gamma. El enlace  
5 total y no específico se mide en ausencia de ET-1 no radioactiva y de anticuerpos anti-ET, respectivamente. Bajo estas condiciones, la ET-1 y la ET-1 grande desplazan el enlace de [ $^{125}$ I]ET-1 con los anticuerpos con valores  $IC_{50}$  de  $21 \pm 2$  y  $260,000 \pm 66,000$  fmol (promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3-5$ ),  
10 respectivamente.

Con el objeto de determinar el valor  $IC_{50}$  de un inhibidor, se determina una curva de concentración-respuesta de cada inhibidor. Se utiliza una versión compatible con IBM del programa ALLFIT para ajustar los datos a un modelo de un sitio.

15 La inhibición de ECE también se puede determinar in vivo, midiendo la inhibición de la respuesta presora inducida por ET-1 grande en la rata anestesiada o consciente, como se describe más adelante. Se mide el efecto de los inhibidores sobre la respuesta presora resultante de la agresión con ET-1  
20 grande en ratas Sprague-Dawley, como se describe en Biochem. Mol. Biol. Int., Volumen 31, número 5, páginas 861-867 (1993). Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de la respuesta presora inducida por ET-1 grande, comparándose con el vehículo.

25 Las ratas Sprague-Dawley machos se anestesian con

Inactina (100 miligramos/kilogramo intraperitonealmente), y se instrumentan con catéteres en la arteria femoral y en la vena para registrar la presión arterial media (MAP) y administrar los compuestos, respectivamente. Se realiza una traqueotomía y se inserta una cánula en la tráquea para asegurar la patencia de las vías respiratorias. La temperatura corporal de los animales se mantiene a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por medio de un manto de calentamiento. En seguida de la cirugía, se permite que se establezca la presión arterial media antes de interrumpir la neurotransmisión autónoma con clorisondramina (3 miligramos/kilogramo intravenosamente). Luego las ratas se tratan con el compuesto de prueba a 10 miligramos/kilogramo intravenosamente, o con el vehículo, y se agreden con ET-1 grande (1 nanomol/kilogramo intravenosamente) 15 y 90 minutos después. En general, los datos se reportan como el máximo incremento en la presión arterial media producida por ET-1 grande en los animales tratados con el compuesto de prueba o con el vehículo.

Las ratas Sprague-Dawley machos se anestesian con metohexital-sodio (75 miligramos/kilogramo intraperitonealmente), y se instrumentan con catéteres en la arteria femoral y en la vena para medir la presión arterial media y administrar los fármacos, respectivamente. Los catéteres se roscan a través de un sistema oscilatorio que hace posible que las ratas se mueven libremente después de volver a

obtener la conciencia. Las ratas se dejan recuperarse de este procedimiento durante 24 horas antes de iniciar el estudio. Al día siguiente, se registra la presión arterial media por medio del catéter de la arteria femoral, y se administra un compuesto de prueba o el vehículo por medio de la vena femoral. Los animales se agreden con ET-1 grande a 1 nanomol/kilogramo intravenosamente en diferentes tiempos después de la dosificación. Después de un período de lavado adecuado, dependiendo de la dosis y del régimen, los animales se pueden volver a probar con otra dosis del compuesto de prueba o del vehículo. En general, los datos se reportan como el cambio en la presión arterial media producido por la ET-1 grande a intervalos de 2 minutos en los animales tratados con el compuesto de prueba, comparándose con aquéllos tratados con vehículo.

La inhibición de ECE también se puede determinar *in vivo* midiendo la inhibición de la respuesta presora inducida por ET-1 grande en SHR conscientes, por ejemplo como se describe en Biochem. Biophys. Res. Commun., Volumen 204, páginas 407-412 (1994).

A las ratas espontáneamente hipertensas machos (de 16 a 18 semanas de edad) se les administra ya sea el compuesto de prueba o el vehículo ( $\text{NaHCO}_3$  1M) por medio de una minibomba osmótica implantada subcutáneamente. En el día 5, se colocan los catéteres arterial y venoso femorales en las ratas

anestesiadas para la medición de la presión arterial media y para la administración del compuesto de prueba, respectivamente. Después de un período de recuperación de 48 horas, se registra la presión arterial media (día 7) a través del catéter arterial conectado a un transductor de presión. Se dejan estabilizar la presión sanguínea y el ritmo cardíaco durante 30 minutos antes de realizar el bloqueo ganglionar utilizando clorisondamina (10 miligramos/kilogramo intravenosamente). Aproximadamente 15 minutos después, se administra una dosis de bolo de ET-1 grande (0.25 nanomoles/kilogramo intravenosamente) tanto a las ratas con vehículo como tratadas con el compuesto de prueba. Luego se compara el cambio en la presión sanguínea en respuesta a la ET-1 grande entre los dos grupos de ratas.

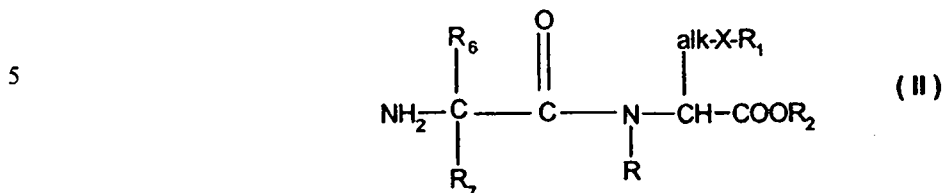
La inhibición del vasoespasma cerebral se demuestra midiendo la inhibición de la construcción experimentalmente inducida de las arterias cerebrales basilares en el conejo (Caner y colaboradores, J. Neurosurg., Volumen 85, páginas 917-922 (1996)).

El grado o la falta de potencial inmunoestimulante indeseable de los compuestos de la invención se puede determinar con el ensayo de nodo linfático popliteal de murino descrito en Toxicology Letters, Volúmenes 112/113, páginas 453-459 (2000).

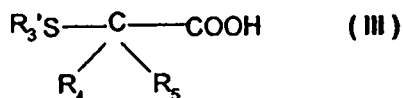
Los compuestos de la invención, por ejemplo, se

pueden preparar,

a) mediante la condensación de un compuesto de la fórmula II:

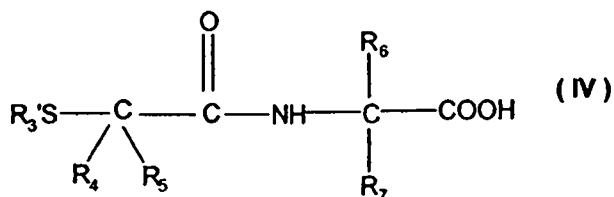


en donde los símbolos alk, X, R, R<sub>1</sub>, R<sub>6</sub>, y R<sub>7</sub> tienen el significado definido anteriormente, y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo esterificado, con un ácido carboxílico de la fórmula III:



o un derivado funcional reactivo del mismo, en donde R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> tienen el significado definido anteriormente; R<sub>3</sub>' representa hidrógeno o un grupo protector de S lábil, por ejemplo acilo, butilo terciario, o bencilo opcionalmente sustituido; o

b) mediante la condensación de un compuesto de la fórmula IV:



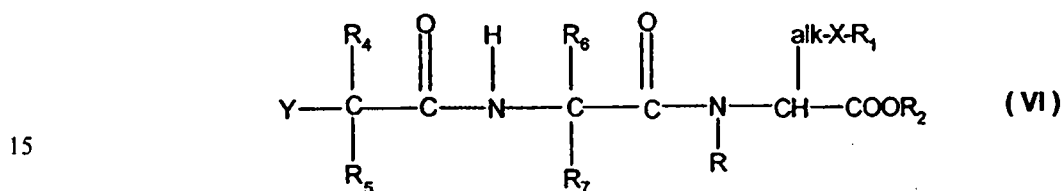
260  
37

o un derivado funcional reactivo del mismo, en donde los símbolos  $R_3'$ ,  $R_4-R_5$  y  $R_6-R_7$  tienen el significado definido anteriormente, con un éster de aminoácido de la fórmula V:



en donde alk, X, R, y  $R_1$  tienen el significado definido anteriormente, y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo esterificado; o

c) mediante la condensación, bajo condiciones básicas, de un compuesto de la fórmula VI:



en donde los símbolos R,  $R_1$ ,  $\text{COOR}_2$ ,  $R_4-R_7$ , alk, y X tienen el significado definido anteriormente, e Y representa un grupo hidroxilo esterificado reactivo (por ejemplo, cloro o bromo) como un grupo saliente, con un compuesto de la fórmula:



o una sal del mismo, en donde  $R_3'$  representa un grupo protector de S lábil, por ejemplo acilo, butilo terciario, o

bencilo opcionalmente sustituido; y convertir un producto resultante a un compuesto de la fórmula I en donde R<sub>3</sub> es hidrógeno;

y en el proceso anterior, si se protegen temporalmente cualesquiera grupos reactivos que interfieran, remover estos grupos protectores, y luego aislar el compuesto resultante de la invención; y si se desea, convertir cualquier compuesto resultante de la invención en otro compuesto de la invención; y/o, si se desea, convertir una función de ácido carboxílico libre en un derivado de éster farmacéuticamente aceptable, o convertir un éster resultante en el ácido libre o en otro derivado de éster; y/o, si se desea, convertir un compuesto libre resultante en una sal, o una sal resultante en el compuesto libre o en otra sal, y/o, si se desea, separar una mezcla de isómeros o racematos, y/o, si se desea, resolver un racemato obtenido en los antípodas ópticos.

En los compuestos de partida y en los intermediarios que se conviertan a los compuestos de la invención de la manera descrita en la presente, los grupos funcionales presentes, tales como los grupos tiol, carboxilo, amino, e hidroxilo, opcionalmente se protegen mediante grupos protectores convencionales que son comunes en la química orgánica de preparación. Los grupos tiol, carboxilo, amino, e hidroxilo protegidos son aquéllos que se pueden convertir bajo condiciones ligeras en los grupos tiol, carboxilo, amino, e

hidroxilo libres, sin que tengan lugar otras reacciones secundarias indeseadas.

El propósito de introducir grupos protectores es proteger a los grupos funcionales de las reacciones indeseadas con los componentes de la reacción y bajo las condiciones utilizadas para realizar una transformación química deseada. La necesidad y elección de grupos protectores para una reacción particular es conocida por los expertos en la técnica, y depende de la naturaleza del grupo funcional que se vaya a proteger (grupo tiol, carboxilo, amino, etcétera), de la estructura y estabilidad de la molécula de la que sea parte el sustituyente, y de las condiciones de la reacción.

Los grupos protectores bien conocidos que satisfacen estas condiciones, y su introducción y remoción, se describen, por ejemplo, en J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres, N.Y. (1973); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, N.Y. 3ª edición (1999), y también en "The Peptides", Volumen I, Schroeder and Luebke, Academic Press, Londres, N.Y. (1965).

La preparación de los compuestos de la invención de acuerdo con el proceso (a), que involucra la condensación de una amina de la fórmula II con el ácido de la fórmula III o un derivado funcional reactivo del mismo, se realiza mediante la metodología bien conocida para la síntesis de péptidos.

La condensación de acuerdo con el proceso (a) de un

aminoéster de la fórmula II con un ácido carboxílico libre de la fórmula III se realiza convenientemente en la presencia de un agente de condensación, tal como diciclohexilcarbodi-imida o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida e

5 hidroxibenzotriazol, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, clorodimetoxitriazina, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (Reactivo BOP), o hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), y trietilamina ó N-metilmorfolina, en

10 un solvente polar inerte, tal como dimetilformamida o cloruro de metileno, de preferencia a temperatura ambiente.

La condensación de un aminoéster de la fórmula II con un derivado funcional reactivo de un ácido de la fórmula III en la forma de un haluro de ácido, convenientemente un cloruro de

15 ácido, o un anhídrido mixto, se realiza en un solvente inerte, tal como tolueno o cloruro de metileno, convenientemente en la presencia de una base, por ejemplo una base inorgánica, tal como carbonato de potasio, o una base orgánica tal como trietilamina, N-metilmorfolina, o piridina, de preferencia a

20 temperatura ambiente.

Los derivados funcionales reactivos de los ácidos carboxílicos de la fórmula III de preferencia son haluros de ácido (por ejemplo, el cloruro de ácido) y anhídridos mixtos, tales como el anhídrido de pivaloílo o de isobutiloxicarbonilo,

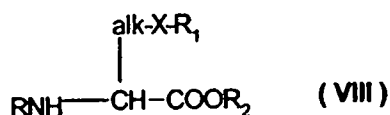
25 o ésteres activados tales como benzotriazol, 7-azabenzotriazol,

264  
41

o hexafluorofeniléster.

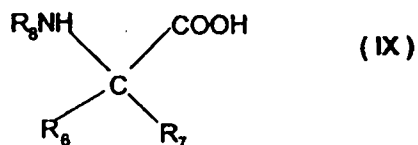
El material de partida de la fórmula II se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en la presente e ilustrados en los ejemplos.

5 La preparación de un material de partida de la fórmula II involucra la acilación de un éster de la fórmula VIII:



10

en donde alk, X, R, y R<sub>1</sub> tienen el significado definido anteriormente, y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo esterificado (por ejemplo, en donde R<sub>2</sub> es alquilo inferior o  
15 bencilo) con un aminoácido apropiadamente N-prottegido (o un derivado funcional reactivo) de la fórmula IX:



20

en donde R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> tienen el significado definido anteriormente en la presente, y R<sub>8</sub> es un grupo protector de amino lábil, por ejemplo t-butoxicarbonilo, para obtener el  
25 compuesto N-prottegido correspondiente de la fórmula II:

La condensación de un compuesto de la fórmula VIII con un compuesto de la fórmula IX se realiza mediante la metodología bien conocida en la síntesis de péptidos, por ejemplo como se describe anteriormente para la condensación de un compuesto de la fórmula II con un compuesto de la fórmula III. El grupo N-protector se remueve de acuerdo con los métodos bien conocidos en este campo, por ejemplo, el T-butoxicarbonilo se remueve con ácido anhidro tal como ácido trifluoroacético o HCl.

Los aminoésteres y ácidos de partida de los compuestos de las fórmulas VIII y IX, respectivamente, son conocidos en la materia, o si son nuevos, se pueden preparar de acuerdo con los métodos bien conocidos en este campo, por ejemplo, o como se ilustra en la presente. Los ésteres de aminoácidos de la fórmula VIII de preferencia son los enantiómeros S.

Los materiales de partida de la fórmula III son conocidos, o si son nuevos, se pueden preparar de acuerdo con los métodos convencionales. Los materiales de partida se preparan, por ejemplo, a partir de los  $\alpha$ -aminoácidos racémicos u ópticamente activos correspondientes, mediante su conversión al derivado  $\alpha$ -bromo, seguida por su desplazamiento con inversión de configuración utilizando el derivado de tiol apropiado de la fórmula VII, bajo condiciones básicas, por ejemplo, como se ilustra en la Solicitud de Patente Europea

Número 524,553 publicada el 27 de enero de 1993. La S-desbencilación de los productos finales resultantes se realiza mediante disociación reductiva, por ejemplo con níquel de Raney en etanol. La S-desacilación se realiza, por ejemplo, mediante  
5 hidrólisis catalizada con base, con hidróxido de sodio acuoso diluido. Los materiales de partida cíclicos de la fórmula III se pueden preparar mediante el tratamiento del ácido carboxílico cíclico (por ejemplo, ácido ciclopentancarboxílico) con azufre en la presencia de una base fuerte, tal como  
10 dietilamida de litio.

La preparación de los compuestos de la invención de acuerdo con el proceso (b), que involucra la condensación de un ácido de la fórmula IV con un éster de aminoácido de la fórmula V, se realiza de una forma similar al proceso (a).  
15 Similarmente, los materiales de partida de la fórmula IV se preparan mediante la condensación de un ácido de la fórmula III con un éster correspondiente a los aminoácidos gem-disustituídos de la fórmula IX (en donde  $R_8$  es ahora hidrógeno) bajo condiciones similares a las descritas anteriormente,  
20 seguido por la remoción del grupo protector de carboxilo.

La preparación de los compuestos de la invención de acuerdo con el proceso (c), que involucra el desplazamiento de un grupo saliente Y en un compuesto de la fórmula VI con un derivado de tiol  $R_3'$ -SH como una sal del mismo, se realiza de  
25 acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica.

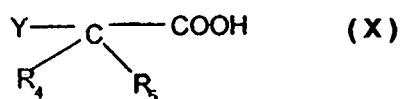
267  
44

Un grupo hidroxilo esterificado reactivo, representado por Y, es un grupo hidroxilo esterificado por un ácido inorgánico u orgánico fuerte. Los grupos Y correspondientes son en particular halógeno, por ejemplo cloro, bromo, o yodo, también los grupos sulfoniloxilo, tales como los grupos alquilo inferior- ó arilsulfoniloxilo, por ejemplo, los grupos (metan-, etan-, bencen-, ó toluen-)sulfoniloxilo, y también el grupo trifluorometilsulfoniloxilo.

El desplazamiento se realiza en un solvente inerte, tal como dimetilformamida o cloruro de metileno en la presencia de una base, tal como carbonato de potasio, trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, y similares, a temperatura ambiente o elevada.

Utilizando una sal de  $R_3'SH$  (por ejemplo, tioacetato de potasio), la reacción se realiza en ausencia de una base, en un solvente inerte, tal como tetrahidrofurano o dimetilformamida.

De una manera similar, los materiales de partida de la fórmula VI se pueden preparar mediante la reacción del derivado de dipéptido de la fórmula II con un ácido de la fórmula:



en donde  $R_4$  y  $R_5$  e Y tienen el significado definido

anteriormente, bajo las condiciones descritas para el proceso (a).

Los compuestos de la fórmula X, en donde Y es halógeno, tales como los ácidos  $\alpha$ -bromocarboxílicos, son conocidos y se preparan, por ejemplo, como se describe en la Solicitud Internacional Número WO 99/55726 publicada el 4 de noviembre de 1999.

Los compuestos de la invención y los intermediarios, por ejemplo aquéllos de las fórmulas II, V, y VI, que tienen la cadena lateral  $\text{alk-X-R}_1$ , se preparan a partir de los compuestos correspondientes que tienen la cadena lateral  $\text{alk-X}'$ , en donde X' representa amino, hidroxilo, tiol, o un grupo saliente adecuado, de acuerdo con la metodología conocida en la materia e ilustrada en la presente. Por ejemplo, los ácidos y ésteres de la fórmula V se pueden obtener empezando con serina, homoserina, treonina, cisteína, y similares, de preferencia en una forma ópticamente activa.

Ciertos compuestos de la invención e intermediarios se pueden convertir unos con otros de acuerdo con las reacciones generales bien conocidas en este campo.

Los mercaptanos libres se pueden convertir a los derivados de S-acilo, mediante su reacción con un derivado reactivo de un ácido carboxílico (correspondiente a  $\text{R}_3$ , siendo acilo en la fórmula I), tal como un anhídrido de ácido o el cloruro, de preferencia en la presencia de una base, tal como trietilamina,

en un solvente inerte tal como acetonitrilo o cloruro de metileno.

Los alcoholes libres y los fenoles se pueden convertir a los derivados de acilo correspondientes, por ejemplo mediante su reacción con un cloruro de ácido correspondiente en la presencia de una base, tal como trietilamina.

Los mercaptanos libres, en donde  $R_3$  representa hidrógeno, se pueden oxidar hasta los disulfuros correspondientes, por ejemplo mediante oxidación en aire, o con el uso de agentes oxidantes ligeros, tales como yodo en una solución alcohólica. Inversamente, los disulfuros se pueden reducir hasta los mercaptanos correspondientes, por ejemplo con agentes reductores, tales como borohidruro de sodio, zinc, y ácido acético, o tributilfosfina.

Los ésteres de ácido carboxílico se pueden preparar a partir de un ácido carboxílico mediante su condensación, por ejemplo, con el haluro correspondiente a  $R_2-OH$ , en la presencia de una base, o con un exceso del alcohol en la presencia de un catalizador de ácido, de acuerdo con los métodos bien conocidos en la materia.

Los ésteres de ácido carboxílico y los derivados de S-acilo se pueden hidrolizar, por ejemplo, con álcali acuoso, tal como con carbonatos o hidróxidos de metales alcalinos. Los grupos S-acilo y éster se pueden remover selectivamente, como

se ilustra en la presente.

De preferencia, y siempre que sea posible, los isómeros preferidos de la invención de la fórmula Ia se preparan a partir de los enantiómeros puros.

- 5 En el caso de que se obtengan mezclas de estereoisómeros (por ejemplo, diastereómeros), éstas se pueden separar mediante procedimientos conocidos, tales como cristalización fraccionaria y cromatografía (por ejemplo, cromatografía de capa delgada, en columna, por evaporación).
- 10 Los ácidos libres racémicos se pueden resolver en los antípodos ópticos mediante cristalización fraccionaria de las sales de d- ó l-( $\alpha$ -metilbencilamina, cinconidina, cinconina, quinina, quinidina, deshidroabietilamina, brucina, o estricnina), y similares. Los productos racémicos, si no son
- 15 diastereoisómeros, se pueden convertir primero a los diastereoisómeros con reactivos ópticamente activos (tales como alcoholes ópticamente activos para formar ésteres), los cuales se pueden luego separar como se describe anteriormente, y, por ejemplo, se hidrolizan para obtener el enantiómero individual.
- 20 Los productos racémicos también se pueden resolver mediante cromatografía quiral, por ejemplo cromatografía de líquidos a alta presión utilizando un absorbente quiral; también mediante resolución enzimática, por ejemplo de ésteres con alcalasa.

Las reacciones anteriormente mencionadas se realizan

25 de acuerdo con los métodos estándares, en la presencia o en

271  
48

ausencia de diluyentes, de preferencia tales como sean inertes para los reactivos y sean solventes de los mismos, de catalizadores, agentes de condensación alcalinos o ácidos u otros agentes, respectivamente, y/o inertes para los reactivos y que sean solventes de los mismos, de catalizadores, agentes de condensación alcalinos o ácidos u otros agentes, respectivamente, y/o atmósferas inertes, a bajas temperaturas, a temperatura ambiente, o a temperaturas elevadas, de preferencia cerca del punto de ebullición de los solventes utilizados, a presión atmosférica o superatmosférica.

La invención incluye además cualquier variante de estos procesos, en donde se utiliza un producto intermediario que se pueda obtener en cualquier etapa del proceso como un material de partida y se realizan cualesquiera pasos restantes, o se descontinúa el proceso en cualquier etapa del mismo, o en donde los materiales de partida se formen bajo las condiciones de reacción, o en donde los componentes de reacción se utilicen en la forma de sus sales o antípodas ópticamente puros. Principalmente, en las reacciones se deben utilizar los materiales de partida que conduzcan a la formación de los compuestos indicados anteriormente como preferidos.

La presente invención se refiere adicionalmente al uso en mamíferos de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables, o composiciones farmacéuticas de los mismos, como medicamentos,

para inhibir tanto ACE como NEP, y, por ejemplo, para la prevención o el tratamiento de desórdenes cardiovasculares, tales como hipertensión, edema, retención de sal, e insuficiencia cardíaca congestiva, ya sea solos o en  
5 combinación con uno o más agentes diferentes que sean útiles para el tratamiento de tales desórdenes. Estos pueden ser agentes anti-hipertensivos, agentes anti-ateroescleróticos, agentes cardíacos, agentes diuréticos, agentes antidiabéticos, agentes reductores del colesterol, y similares. Cuando se  
10 utilizan en combinación con otros agentes terapéuticos, se pueden administrar por separado o en una combinación fija.

Los ejemplos de los agentes terapéuticos que se pueden utilizar en combinación son antagonistas del receptor de angiotensina II, tales como valsartan, losartan, candesartan,  
15 eprosartan, irbesartan, y telmisartan; bloqueadores  $\beta$ , tales como bisoprolol, propanolol, atenolol, sotalol, y metoprolol; inhibidores de renina; bloqueadores del canal de calcio, tales como amiodipina, verapamil, diltiazem, bepridil, felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, y nisoldipina;  
20 inhibidores de sintasa de aldosterona/antagonistas de aldosterona, tales como eplerenona, (+)-fadrozol (Publicación Internacional Número WO 07/76574), espironolactona, y canrenona; diuréticos, tales como furosemina, hidroclorotiazida, indapamida, metazolona, amilorida, y  
25 triamtereno; antagonistas del receptor de vasopresina, tales

como OPC 21268, SR 49059, SR121463A, SR49059, VPA985, OPC31260, e YM087; fármacos cardiotónicos, tales como enoximona y levosimendan; antagonistas de endotelina e inhibidores de ECE, tales como bosentan, BMS193884, TBC3711 y los compuestos dados a conocer en la Publicación Internacional Número WO 99/55726; agentes anti-ateroescleróticos, en particular agentes reductores del colesterol, tales como secuestrantes de ácido biliar (por ejemplo, colestiramina y colestipol); inhibidores de la absorción de colesterol, tales como ezetimiba; fibratos, tales como fenofibrato y gemfibrozil; inhibidores de HMG-CoA-reductasa de estatina, tales como atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina, y pitavastatina; y derivados del ácido nicotínico; agentes tiromiméticos, tales como los dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,569,674 y en la Publicación Internacional Número WO 00/58279; también agentes antidiabéticos, tales como repaglinida, nateglinida, metformina, rosiglitazona, pioglitazona, gluburida, glipizida, glimepirida, DPP728, LAF237, NH622, y DRF4158.

La presente invención también se refiere al uso de los compuestos de la invención para la preparación de composiciones farmacéuticas, en especial composiciones farmacéuticas que tengan una actividad inhibidora de ACE y NEP, y, por ejemplo, una actividad anti-hipertensiva.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la

274  
51

invención son aquéllas adecuadas para administración enteral, tal como oral o rectal, transdérmica y parenteral a mamíferos, incluyendo el hombre, para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares, tales como hipertensión, las cuales  
5 comprenden una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solo o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, así como en combinación con otros agentes terapéuticos también útiles  
10 para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares, como se indicó anteriormente.

Los compuestos farmacológicamente activos de la invención son útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprendan una cantidad efectiva de los  
15 mismos en conjunto o en mezcla con excipientes o vehículos adecuados para su aplicación enteral o parenteral. Se prefieren las tabletas y las cápsulas de gelatina que comprendan al ingrediente activo, junto con a) diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, y/o  
20 glicina; b) lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, sus sales de magnesio o calcio, y/o polietilenglicol; para tabletas también c) aglutinantes, por ejemplo silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de  
25 sodio, y/o polivinilpirrolidona; si se desea d) desintegrantes,

por ejemplo almidones, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y si se desea, absorbentes, colorantes, saborizantes, y edulcorantes. Las composiciones inyectables de preferencia son soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios convenientemente se preparan a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Estas composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservadores, estabilizantes, humectantes, o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica, y/o reguladores del pH. En adición, las composiciones también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación, o recubrimiento, respectivamente, y contienen de aproximadamente el 0.1 al 75 por ciento, de preferencia de aproximadamente el 1 al 50 por ciento del ingrediente activo.

Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención con un vehículo. Los vehículos convenientes incluyen solventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del huésped. De una manera característica, los dispositivos transdérmicos están en la forma de un parche que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene al compuesto, opcionalmente con vehículo, opcionalmente una barrera de control de velocidad para

suministrar el compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y previamente determinada durante un período de tiempo prolongado, y elementos para asegurar el dispositivo a la piel.

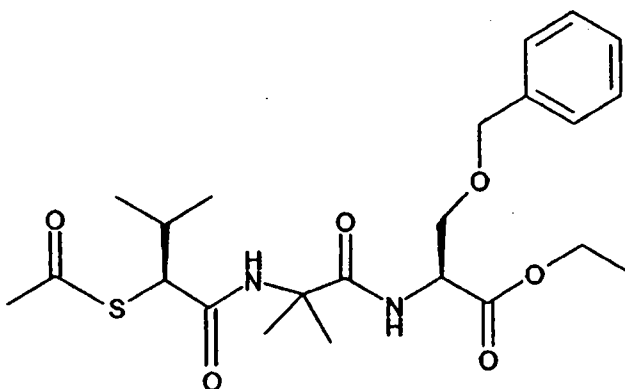
5           Una dosificación unitaria para un mamífero de aproximadamente 50 a 70 kilogramos, puede contener entre aproximadamente 10 y 200 miligramos del ingrediente activo. La dosificación del compuesto activo depende de la especie de animal de sangre caliente (mamífero), del peso corporal, de la  
10   edad, y de la condición individual, y de la forma de administración.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones sobre la misma. Las temperaturas se dan en grados centígrados. Si no se  
15   menciona de otra manera, todas las evaporación se realizan bajo presión reducida, de preferencia entre aproximadamente 15 y 100 mm Hg. Las rotaciones ópticas (expresadas en grados) se miden a temperatura ambiente a 589 nM (D línea de sodio) u otras longitudes de onda especificadas en los ejemplos. La estructura  
20   de los ejemplos se confirma mediante métodos analíticos convencionales, tales como espectro de masas, análisis elemental, RMN, espectroscopía IR, y similares.

Los prefijos R y S se utilizan para indicar la configuración absoluta en cada centro asimétrico.

277  
54Ejemplo 1

(a) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina:



10

Se disuelve etiléster de N-[2-[-[(R)-3-bromo-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina (4.96 gramos, 10.5 milimoles) en tetrahidrofurano (100 mililitros), y se agrega tioacetato de potasio (6.00 gramos, 52.5 milimoles). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se diluye con acetato de etilo (500 mililitros), y se lava con agua (100 mililitros), con una solución de bicarbonato de sodio (100 mililitros dos veces), agua (100 mililitros dos veces), y luego salmuera (50 mililitros). La solución se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía por evaporación (gel de sílice, 3:2 de hexano/acetato de etilo), para dar el compuesto del título; p.f. 55-57°C;  $[\alpha]^{20}_D$  -63.5° (c = 0.99, CH<sub>3</sub>OH); MS(M+H):467.

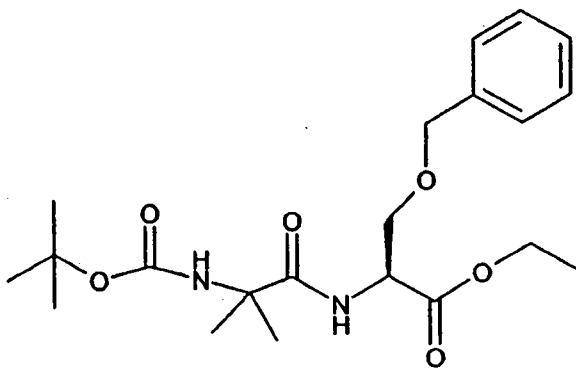
25

El material de partida se prepara como sigue:

228  
55

Una solución de O-bencil-L-serina (9.75 gramos, 50 milimoles) en etanol (200 mililitros) se satura con gas de HCl durante 8 minutos. La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente, y luego se concentra al vacío. El sólido se lava con dietiléter, y se recolecta mediante filtración para dar el clorhidrato de etiléster de O-bencil-L-serina como un sólido blanco.

A una solución de BOC- $\alpha$ -metilalanina (3.05 gramos, 15 milimoles), clorhidrato de etiléster de O-bencil-L-serina (3.89 gramos, 15 milimoles), 1-etil-3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 2.88 gramos, 15 milimoles), y 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAT, 2.04 gramos, 15 milimoles) en cloruro de metileno (150 mililitros), se le agrega trietilamina (1.52 gramos, 15 milimoles). La mezcla se agita durante la noche, y luego se concentra al vacío. El residuo se vuelve a disolver en acetato de etilo, y se lava con agua, HCl 1N, agua, y salmuera. La solución se seca sobre sulfato de sodio, y se concentra para dar el etiléster de N-[2-(BOC-amino)-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina de la fórmula:

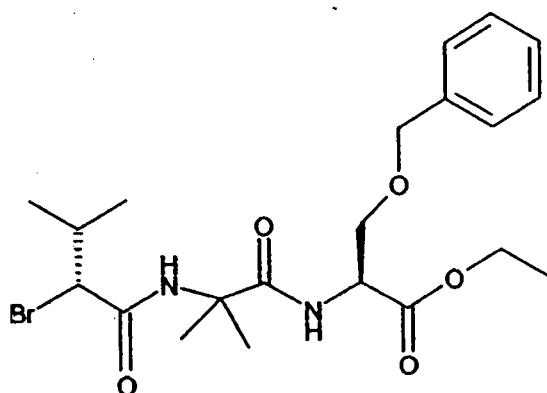


279  
56

El carbamato anterior (6.12 gramos, 15 milimoles) se disuelve en cloruro de metileno (200 mililitros), y se enfría en un baño de hielo. La solución se satura con gas de HCl durante 10 minutos, y luego se agita a temperatura ambiente durante la noche. El residuo se concentra. Se agrega cloruro de metileno, y el residuo se concentra nuevamente para dar el clorhidrato de etiléster de N-(2-amino-2-metilpropionil)-O-bencil-L-serina como una espuma; MS(M+H):309.

A una solución del clorhidrato de amina anterior (4.90 gramos, 14 milimoles) en cloruro de metileno (150 mililitros), se le agrega sal de di-isopropilamina del ácido (R)2-bromo-3-metilbutanoico (4.03 gramos, 14 milimoles), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida (EDCI, 2.70 gramos, 14 milimoles), y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT, 1.90 gramos, 14 milimoles). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentra al vacío. El residuo se disuelve en acetato de etilo y se lava con agua, bicarbonato de sodio diluido, agua, HCl 1N, y luego salmuera. La solución se seca sobre sulfato de sodio y se concentra para dar un sólido. El sólido se purifica mediante cromatografía por evaporación (gel de sílice, 2:1 de hexano/acetato de etilo), para dar el etiléster de N-[2-(R)-2-bromo-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina de la fórmula:

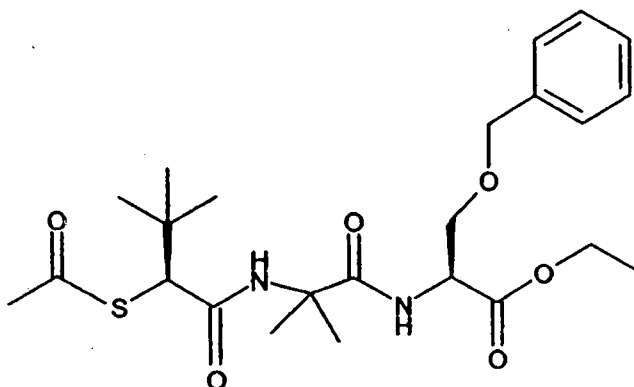
5



De una manera similar, se preparan:

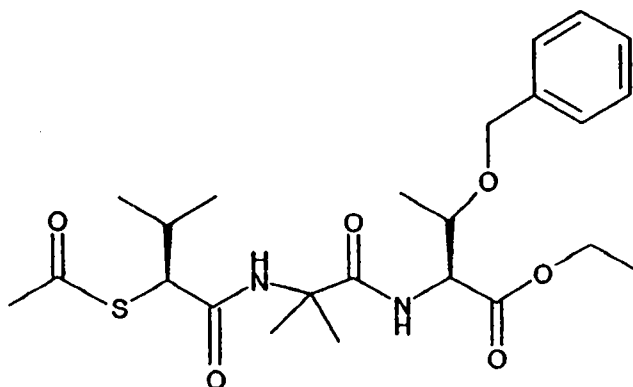
(b) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3,3-dimetilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina:

15



(c) Etiléster de N-[2-[(S)-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-treonina; p.f. 121-22°C:

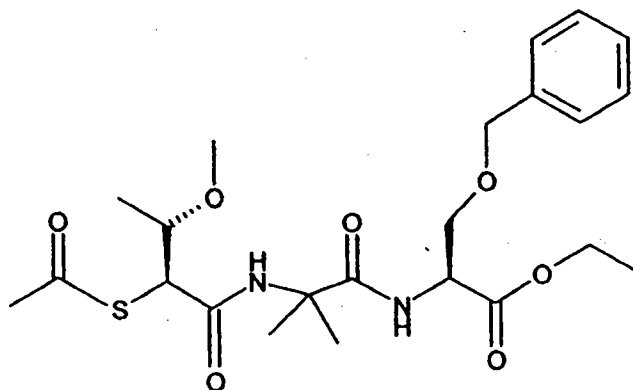
20



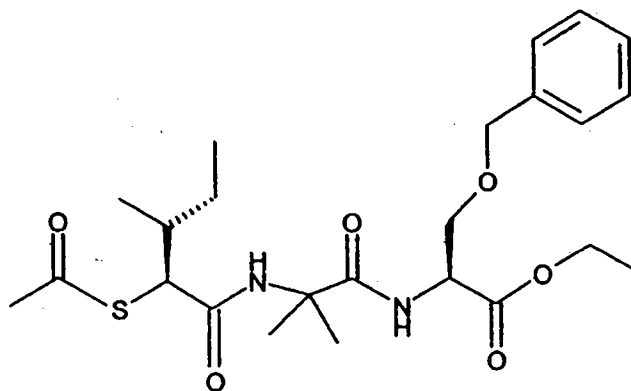
25

201  
58

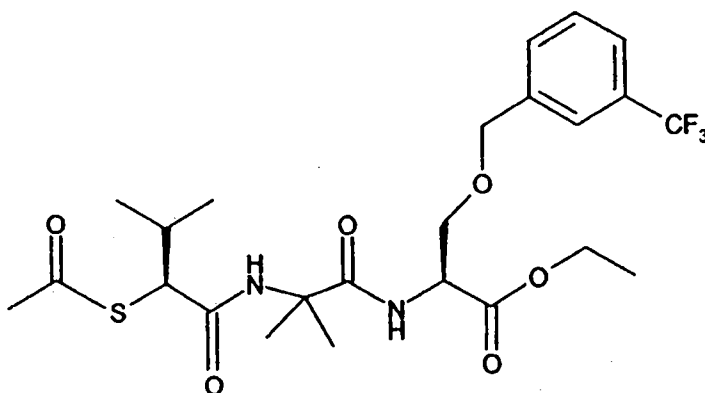
(d) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metoxibutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina,  $[\alpha]_D^{20} + 14.9^\circ$  (c = 1.04, DMSO):



(e) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilpentanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D^{20} - 6.93^\circ$  (c = 1.09, CH<sub>3</sub>OH):



(f) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(3-trifluorometilbencil)-L-serina:

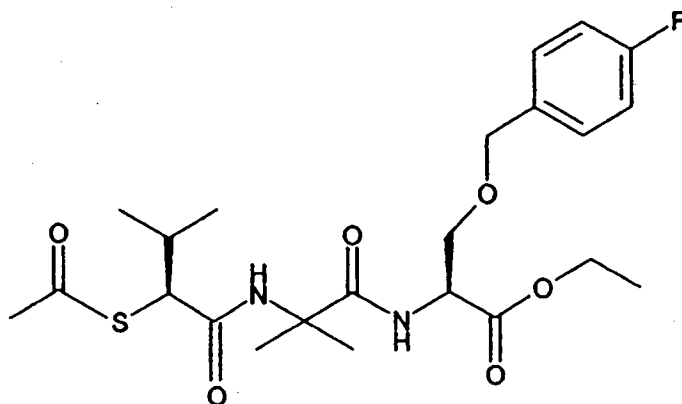
282  
59

El clorhidrato de etiléster de O-(3-trifluorometilbencuil)-L-serina de partida se prepara como sigue:

A una suspensión de hidruro de sodio (60 por ciento en aceite, 3.04 gramos, 76 milimoles) en N,N-dimetilformamida (60 mililitros) a 0°C, se le agrega BOC-L-serina (7.80 gramos, 38 milimoles). La mezcla se agita durante 1 hora, y luego se agrega cloruro de m-trifluorometilbencilo (7.39 gramos, 38 milimoles). La mezcla se deja calentar a temperatura ambiente, y se agita durante la noche. La mezcla se apaga con agua. Se agrega acetato de etilo, y la mezcla se lava con salmuera, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentra para dar un aceite amarillo, el cual se purifica mediante cromatografía por evaporación (SiO<sub>2</sub>; hexano/acetato de etilo) para dar un aceite transparente. El residuo se disuelve en etanol (120 mililitros), la solución se enfría a 0°C, y se satura con gas de HCl durante 5 minutos. La mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla se

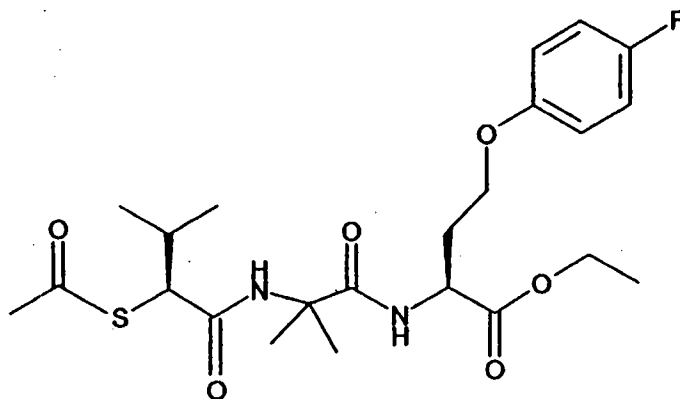
concentra para dar el clorhidrato de etiléster de O-(4-trifluorometilbencil)-L-serina.

(g) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-  
5 2-metilpropionil]-O-(4-fluorobencil)-L-serina como un aceite:



10

(h) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-  
15 2-metilpropionil]-O-(4-fluorofenil)-L-homoserina como un  
aceite.



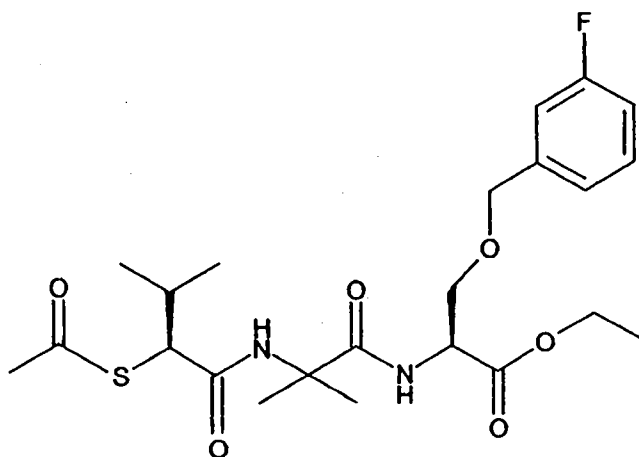
20

El clorhidrato de etiléster de O-(4-fluorofenil)-L-  
25 homoserina de partida se prepara como sigue:

A una solución de t-butiléster de BOC-L-homoserina (3.2 gramos, 11.6 milimoles) en tetrahidrofurano, se le agrega trifenilfosfina (7.59 gramos, 29 milimoles), p-fluorofenol (2.08 gramos, 18.6 milimoles), y 1,1'-azobis-(N,N-dimetilformamida) (3.2 gramos, 18.6 milimoles). La mezcla se agita durante la noche, se lava con salmuera, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, y el solvente se remueve para dar un aceite naranja. El aceite se purifica mediante cromatografía por evaporación (SiO<sub>2</sub>, 85 por ciento de hexano/15 por ciento de acetato de etilo), para dar un aceite transparente, el cual se disuelve en etanol (100 mililitros), y la solución se satura con gas de HCl, y luego se agita durante la noche. La mezcla se concentra para dar el clorhidrato de etiléster de O-(4-fluorofenil)-L-homoserina como un sólido blanco.

15

(i) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metil-butanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(3-fluorofenil)-L-homoserina:



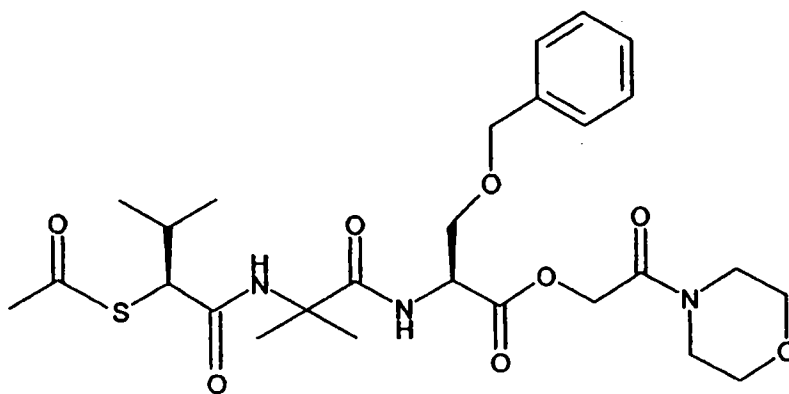
25

~~285~~  
62

(j) Morfolinocarbonilmetiléster de N-[2-[(S)-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice con hexano, acetato de etilo, metanol (20:70:10) como un sólido blanco:

5

10



El material de partida se prepara como sigue:

La O-bencil-L-serina (10.0 gramos, 51.3 milimoles),  
15 dicarbonato de diterbutilo (11.2 gramos, 51.4 milimoles), e  
hidróxido de sodio 1N (103 mililitros, 103 milimoles), se  
agitan juntos en 100 mililitros de dioxano a temperatura  
ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentra al vacío, se  
recupera en agua, se acidifica hasta un pH de 1 con HCl 6N, y  
20 se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con  
agua, luego salmuera, y se seca sobre sulfato de magnesio  
anhidro. La mezcla se filtra y se concentra al vacío para dar  
BOC-O-bencil-L-serina como un aceite. Se agrega 4-(2-  
cloroacetil)morfolina (1.22 gramos, 7.48 milimoles) a una  
25 solución de BOC-O-bencil-L-serina (2.20 gramos, 7.46

61

285  
63

milimoles), trietilamina (0.075 gramos, 7.43 milimoles), y yoduro de sodio (0.11 gramos, 0.73 milimoles) en 5 mililitros de N,N-dimetilformamida, y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se diluye con acetato de etilo, se lava con agua, luego con salmuera, y se seca sobre sulfato de magnesio anhidro. La mezcla se filtra y se concentra al vacío para dar un aceite amarillo. El aceite se pasa por cromatografía sobre gel de sílice con hexano:acetato de etilo:metanol (35:60:5), para dar el

10 morfolinocarbonilmetiléster de BOC-O-bencil-L-serina como un aceite incoloro. Se burbujea gas de HCl a través de una solución del éster de carbamato (1.72 gramos, 4.08 milimoles) en cloruro de metileno (50 mililitros) durante 5 minutos, y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. La

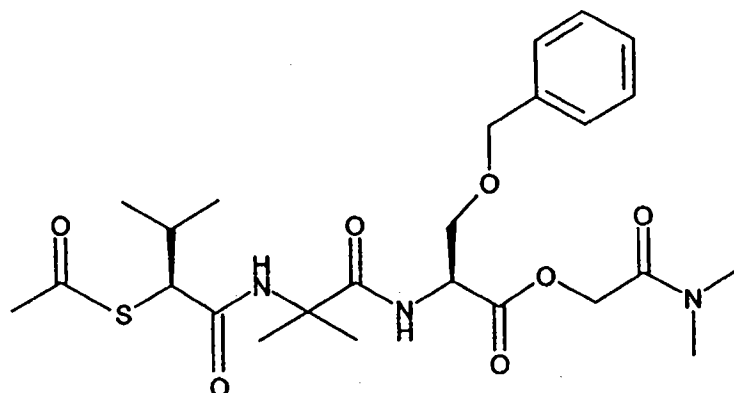
15 mezcla resultante se concentra al vacío para dar el morfolinocarbonilmetiléster de O-bencil-L-serina como una espuma.

(k) Dimetilaminocarbonilmetiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; se prepara y se purifica como se describe para el compuesto del

20 Ejemplo 1(j):

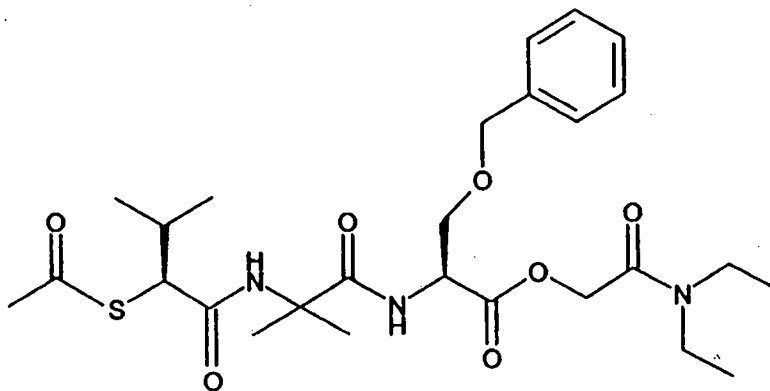
287  
64

5



(1) Dietilaminocarbonilmetiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; se  
 10 prepara como se describe para el compuesto del Ejemplo 1(j), y se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice con hexano, acetato de etilo, metanol (35:60:5):

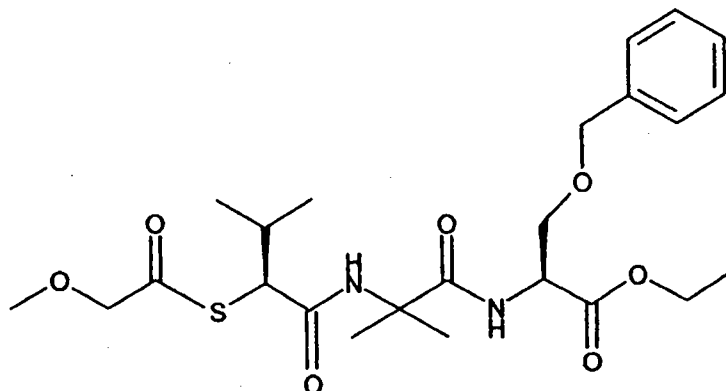
15



20 (m) Etiléster de N-[2-[(S)-[(metoxiacetil)tio]-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D$   
 - 55.27°; (c = 1.084, CH<sub>3</sub>OH):

25

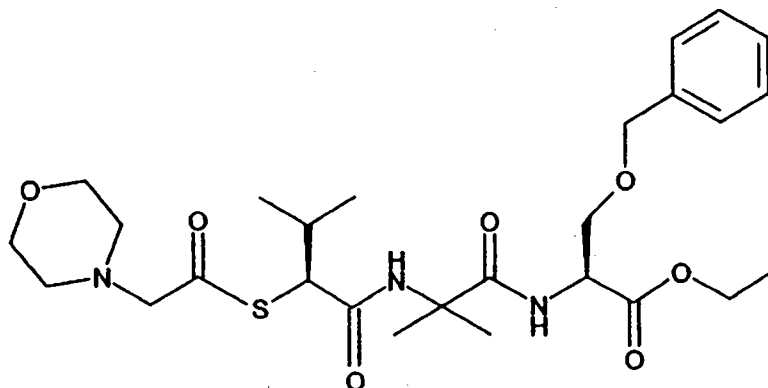
5



(n) Etiléster de N-[2-[(S)-2-[(morfolinoacetil)tio]-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D$

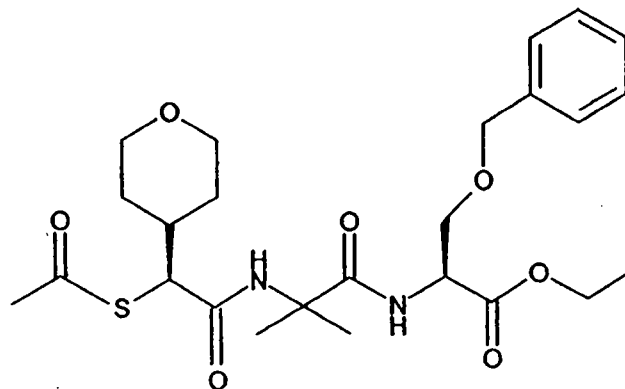
10  $-48.61^\circ$  ( $c = 1.098$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ):

15



(o) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-2-(4-tetrahidropiranil)acetilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D^{20} -55.4^\circ$  ( $c = 0.83$ ,  $\text{DMSO}$ ):

20

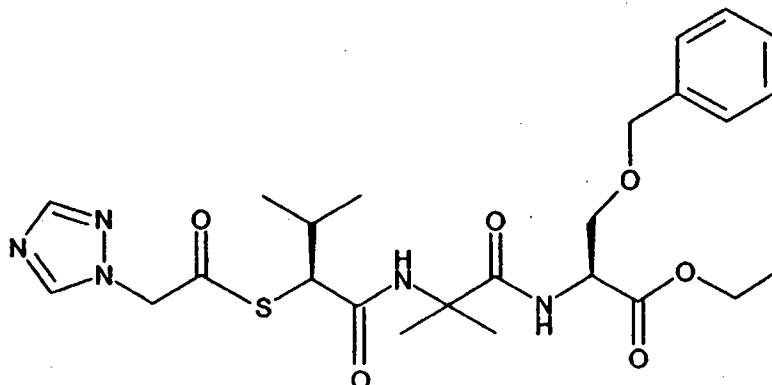


25

El ácido (D)- $\alpha$ -bromo- $\alpha$ -(4-tetrahidropiranyl)-acético de partida se puede preparar como sigue:

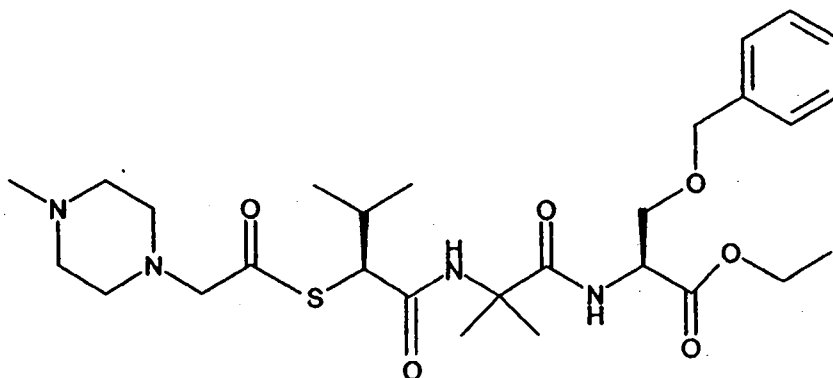
Una solución de nitrito de sodio (4.71 gramos, 68.3 milimoles) en 35 mililitros de agua, se agrega por goteo a una  
5 solución helada (0°C) de (D)- $\alpha$ -bromo- $\alpha$ -(4-tetrahidropiranyl)-glicina (J. Am. Chem. Soc., Volumen 117, páginas 9375-9376 (1995)) (7.05 gramos, 44.3 milimoles) y HBr al 48 por ciento (acuoso) (70 mililitros) en 35 mililitros de agua. Al terminarse la adición, la mezcla se deja calentar a temperatura  
10 ambiente, y se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se extrae con acetato de etilo; la capa orgánica se lava en secuencia con agua, tiosulfato de sodio acuoso al 5 por ciento, y salmuera, luego se seca sobre sulfato de magnesio anhidro. La mezcla se filtra y se concentra al vacío para dar  
15 ácido (D)- $\alpha$ -bromo- $\alpha$ -(4-tetrahidropiranyl)-acético como un sólido.

(p) Etiléster de N-[2-[(S)-2-[(1-(1,2,4)-triazol)tioacetil]-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; p.f. 106-107°C;  $[\alpha]_D$  61.46° (c = 1.09, CH<sub>3</sub>OH):

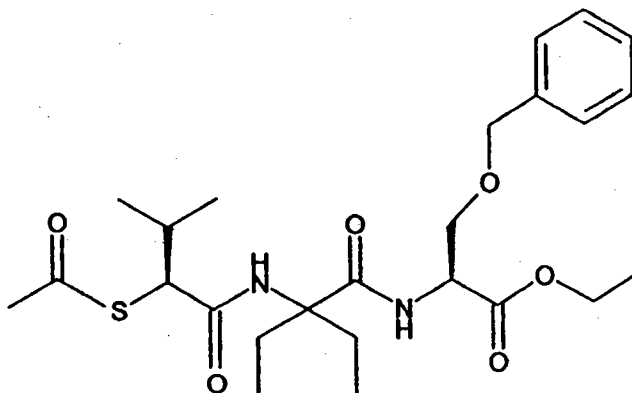


290  
67

(q) Etiléster de N-[2-[(S)-2-[(4-metilpiperazino)tioacetil]-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; p.f. 95-96°;  $[\alpha]_D$  48.5° (c = 0.935, CH<sub>3</sub>OH):



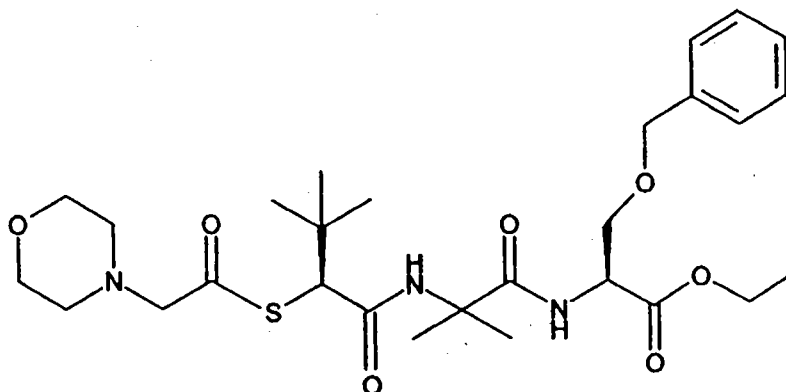
(r) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-etilbutanoil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D$  -83.6° (c = 1.07, CH<sub>3</sub>OH):



(s) Etiléster de N-[2-[(S)-2-(morfolinotioacetil)-3,3-dimetilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D$  -55.5° (c = 1.008, DMSO):

29+  
68

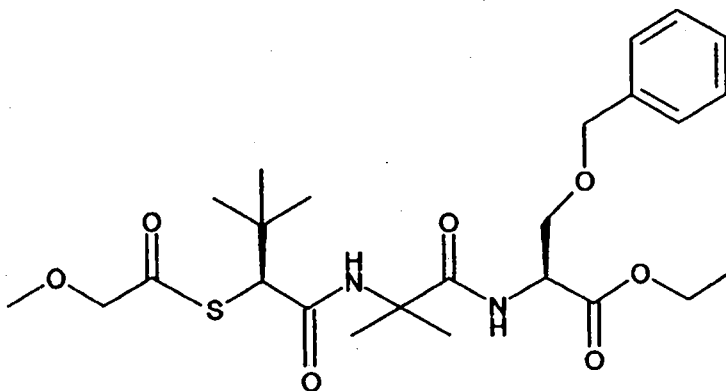
5



(t) Etiléster de N-[2-[(S)-2-[(metoxiacetil)tio]-3,3-dimetilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D$

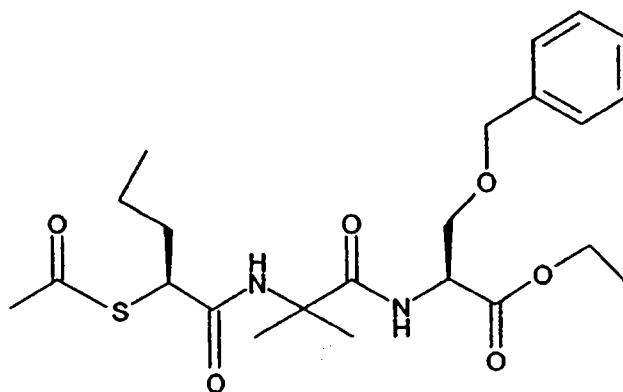
10  $-61.67^\circ$  ( $c = 1.024$ , DMSO):

15



(u) Etiléster de N-[2-[(S)-2-(tioacetil)pentanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina:

20

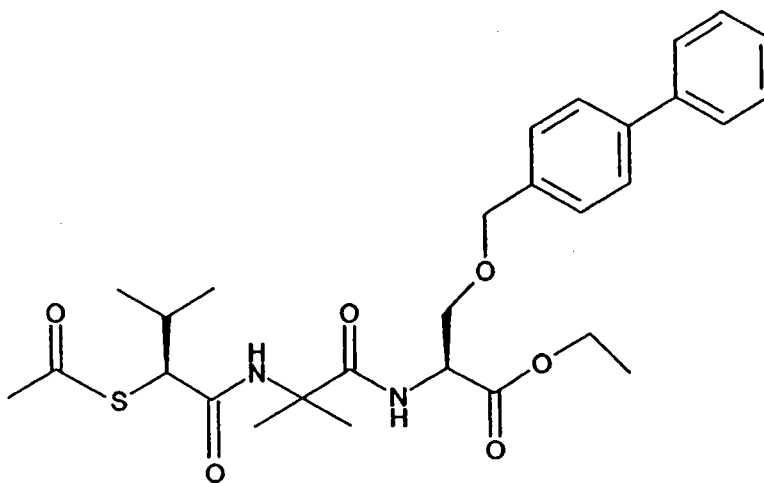


25

(v) Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil)-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(4-bifenililmetil)-L-serina:

5

10

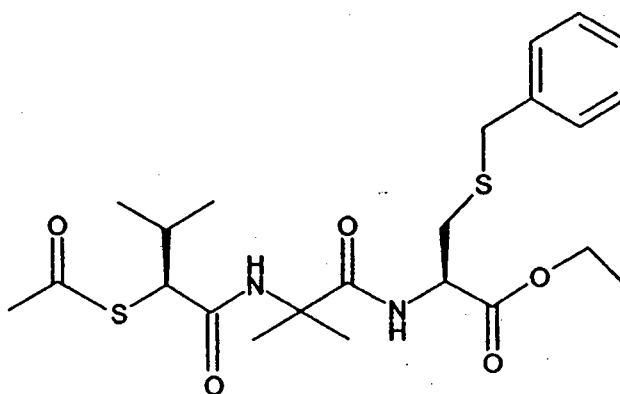


### Ejemplo 2

Etiléster de N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-S-bencil-L-cisteína:

15

20



El compuesto del título se prepara de una manera similar al Ejemplo 1, y se recrystaliza a partir de metiliterbutiléter/hexano, p.f. 69-71°C.

25

293  
70

El material de partida se prepara como sigue:

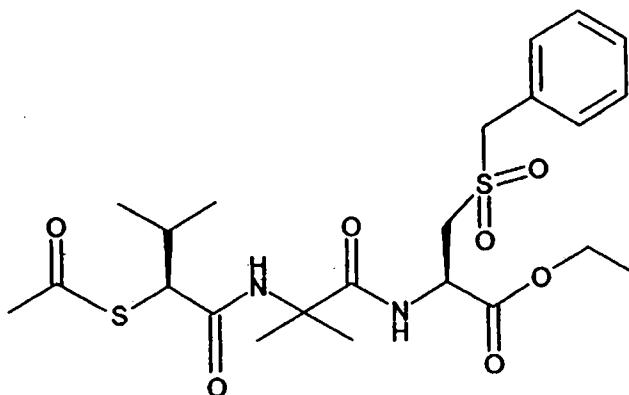
Se burbujea HCl(g) en una solución de BOC-S-bencil-L-cisteína (9.33 gramos, 30 milimoles) en etanol (200 mililitros) durante 15 minutos. El recipiente se tapa y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se evapora al vacío, y el residuo se agita en dietiléter (150 mililitros) durante 1.5 horas, para dar el clorhidrato de etiléster de S-bencil-L-cisteína como un sólido.

Una mezcla del clorhidrato de etiléster de S-bencil-L-cisteína (7.98 gramos, 29 milimoles), BOC- $\alpha$ -metilalanina (5.89 gramos, 29 milimoles), trietilamina (2.93 gramos, 29 milimoles), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 3.92 gramos, 29 milimoles), y EDCI (5.57 gramos, 29 milimoles) en cloruro de metileno (200 mililitros), se agita bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se evapora a sequedad, y el residuo se disuelve en acetato de etilo (200 mililitros). La solución se lava con agua (50 mililitros), HCl 1N (50 mililitros), agua (50 mililitros), bicarbonato de sodio al 5 por ciento (50 mililitros), agua (50 mililitros), y finalmente salmuera (25 mililitros). Luego la solución se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora a sequedad para dar el etiléster de N-[2-(BOC-amino)-2-metilpropionil]-S-bencil-L-cisteína.

294  
71Ejemplo 3

Etiléster del ácido N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(bencilsulfonil)-propiónico:

5



10

El compuesto anterior se prepara de una manera similar al Ejemplo 1.

El material de partida se prepara como sigue:

15

A una solución del etiléster de N-[2-(BOC-amino)-2-metilpropionil]-S-bencil-L-cisteína (7.21 gramos, 17 milimoles) en cloruro de metileno (250 mililitros) bajo una atmósfera de argón, se le agrega ácido m-cloroperbenzoico (8.77 gramos, 51 milimoles), y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se evapora a sequedad, y el residuo se disuelve en acetato de etilo (300 mililitros). La solución se lava con bicarbonato de sodio al 5 por ciento (50 mililitros tres veces), agua (50 mililitros), y salmuera (25 mililitros). La solución se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se

20

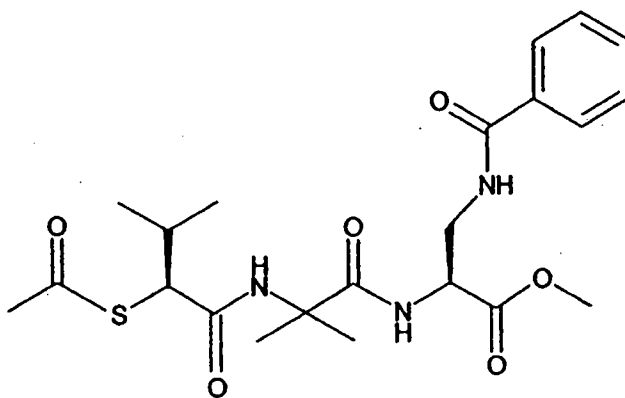
25 evapora al vacío para dar el etiléster del ácido N-[2-(BOC-

295  
72

amino)-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(bencilsulfonil)-  
propiónico.

#### Ejemplo 4

- 5 (a) Metiléster del ácido  $N^2$ -[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(benzoilamino)-propiónico:



- 15 Una mezcla de cloruro de benzoílo (0.085 mililitros, 0.73 milimoles), clorhidrato de metiléster del ácido  $N^2$ -[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2,3-diaminopropiónico (0.29 gramos, 0.73 milimoles), y trietilamina (0.15 mililitros, 1.49 milimoles) en cloruro de metileno (10 mililitros), se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se evapora a sequedad al vacío, el residuo se disuelve en acetato de etilo, y la solución se lava con agua, luego con una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio anhidro, y se evapora a sequedad para dar un aceite.
- 25

29<sup>th</sup>  
73

El aceite se pasa por cromatografía sobre gel de sílice con hexano, acetato de etilo (50:50), para dar el compuesto del título como una espuma blanca; p.f. 48-54°C.

- 5 (b) De una manera similar se prepara el metiléster del ácido N<sup>2</sup>-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(bencensulfonamido)propiónico; p.f. 47-51°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -41.72 (c = 1.03, CH<sub>3</sub>OH).

El material de partida se prepara como sigue:

- 10 Una mezcla del clorhidrato de metiléster del ácido (S)-2-amino-3-(BOC-amino)-propiónico (4.6 gramos, 2.1 milimoles) N-CBZ- $\alpha$ -metilalanina (5.0 gramos, 2.1 milimoles), HOAT (2.87 gramos, 2.1 milimoles), EDCI (4.02 gramos, 2.1 milimoles), y trietilamina (2.93 gramos, 2.1 milimoles) en  
15 cloruro de metileno (50 mililitros), se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentra al vacío. El aceite resultante se pasa por cromatografía sobre gel de sílice con hexano y acetato de etilo  
20 (1:1), para dar el metiléster del ácido N<sup>2</sup>-[2-(CBZ-amino)-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(BOC-amino)-propiónico como una espuma blanca; p.f. 100-101°C.

- Una mezcla del producto anterior (2.14 gramos, 4.90 milimoles), y paladio al 10 por ciento sobre carbón (0.27  
25 gramos) en etanol (50 mililitros), se hidrogena bajo una

207  
74

presión de 3.15 kg/cm<sup>2</sup> en un frasco Parr durante 4 horas. La mezcla se filtra a través de un cojín de Celite, y se concentra al vacío para dar el clorhidrato de metiléster del ácido N<sup>2</sup>-[2-amino-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(BOC-amino)-propiónico

5 como un aceite.

Una solución del producto anterior (2.28 gramos, 8.09 milimoles), sal de di-isopropilamina del ácido (R)-2-bromo-3-metilbutanoico (2.16 gramos, 7.13 milimoles), EDCI (1.43 gramos, 1.49 milimoles), y HOAT (1.15 gramos, 8.52 milimoles) en cloruro de metileno (75 mililitros), se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se evapora a sequedad al vacío, y el residuo se recupera en acetato de etilo. la solución de acetato de etilo se lava con agua, una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera, y luego se seca sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentra al vacío. El aceite resultante se pasa por cromatografía sobre gel de sílice con hexano y acetato de etilo (40:60), para dar el metiléster del ácido N<sup>2</sup>-[2-[(R)-2-bromo-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(BOC-amino)-propiónico como una espuma blanca.

Una mezcla del producto anterior (1.31 gramos, 2.82 milimoles), y tioacetato de potasio (1.28 gramos, 11.2 milimoles) en tetrahidrofurano (50 mililitros), se agita a temperatura ambiente durante 4 horas, y se diluye con acetato de etilo. La mezcla se lava con agua, una solución saturada de

208  
75

bicarbonato de sodio, salmuera, y luego se seca sobre sulfato de magnesio. La mezcla de reacción se concentra a sequedad al vacío, y el aceite resultante se pasa por cromatografía sobre gel de sílice con hexano y acetato de etilo (40:60), para dar  
5 el metiléster del ácido N-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2-amino-3-(BOC-amino)-propiónico.

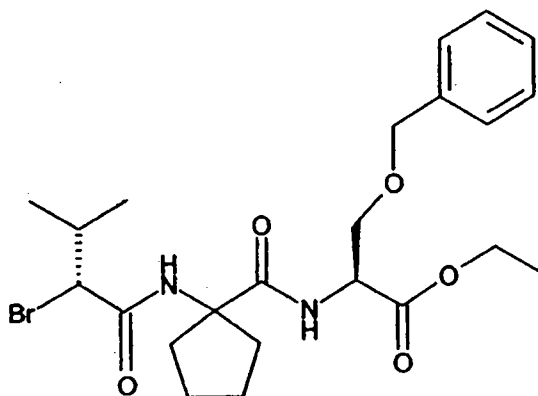
Se burbujea gas de cloruro de hidrógeno a través de una solución del compuesto anterior (1.01 gramos, 2.19  
10 milimoles) en 50 mililitros de cloruro de metileno durante aproximadamente 5 minutos, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas, y luego se concentra al vacío para dar el clorhidrato de metiléster del ácido N<sup>2</sup>-[2-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-(S)-2,3-  
15 diaminopropiónico.

#### Ejemplo 5

A una solución de ácido 1-[(R)-2-bromo-3-metilbutanoilamino]ciclopentancarboxílico (1 gramo, 3.42  
20 milimoles), clorhidrato de etiléster de O-bencil-L-serina (0.89 gramos, 3.42 milimoles), diciclohexilcarbodi-imida (0.7 gramos, 3.42 milimoles), y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0.47 gramos, 3.42 milimoles) en cloruro de metileno, se le agrega trietilamina (0.48 mililitros, 3.42 milimoles). La mezcla se  
25 agita durante 24 horas, y luego se lava con salmuera y se

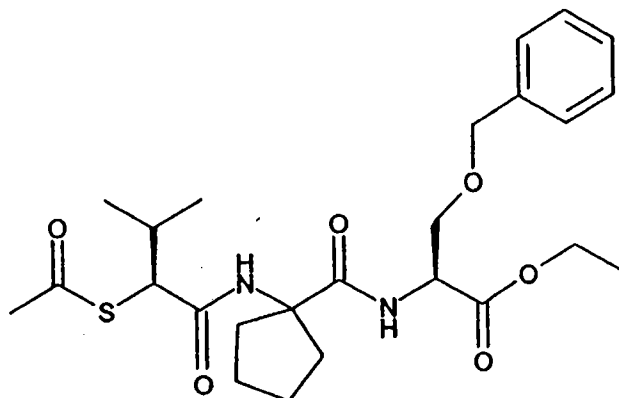
299  
76

concentra al vacío para dar un aceite amarillo claro. El residuo se purifica mediante cromatografía por evaporación (gel de sílice-hexano/acetato de etilo), para dar el etiléster de N-[1-(R)-2-bromo-3-metilbutanoilamino]-ciclopentancarbonil]-O-bencil-L-serina de la fórmula:



El compuesto de bromo (0.7 gramos, 1.41 milimoles) se disuelve en tetrahidrofurano (50 mililitros), y se agrega tioacetato de potasio (0.19 gramos, 1.69 milimoles). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 18 horas, y luego se diluye con acetato de etilo y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio, y se concentra al vacío para dar un aceite amarillo. El material crudo se purifica mediante cromatografía por evaporación (gel de sílice, hexano/acetato de etilo), para dar un semisólido, el cual se tritura con hexano para dar el etiléster de N-[1-[(S)-2-tioacetil-3-metilbutanoilamino]-ciclopentancarbonil]-O-bencil-L-serina de la fórmula:

5



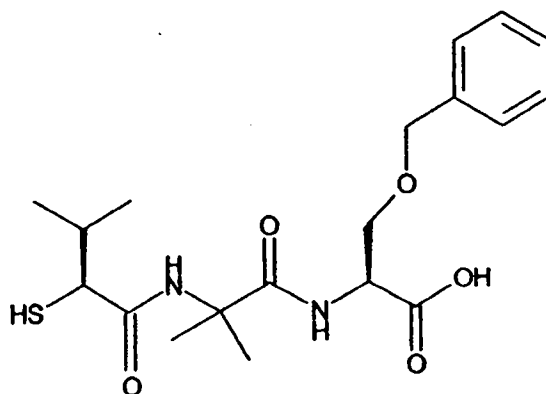
El material de partida de ácido 1-[(R)-2-bromo-3-metilbutanoilamino]ciclopentancarboxílico se prepara esencialmente mediante la metodología descrita en la Publicación Internacional Número WO 99/55726, mediante la condensación de la sal de di-isopropilamina del ácido (R)-2-bromo-3-metilbutanoico (preparada a partir de L-valina) con el clorhidrato de metiléster de cicloleucina.

15

### Ejemplo 6

(a) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina:

20



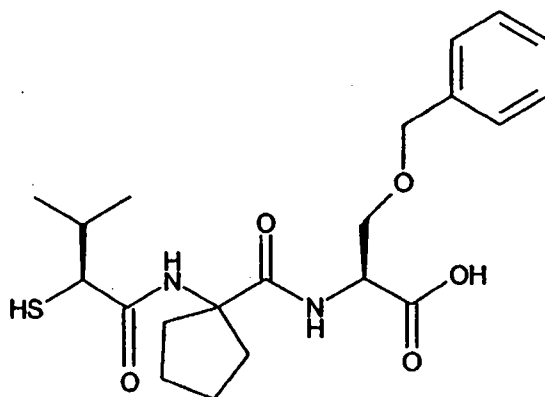
25

30+  
78

A una solución del S-acetiletiléster del Ejemplo 1 (0.47 gramos, 1 milimol) en metanol (10 mililitros), se le agrega hidróxido de sodio 1 N (5.0 mililitros, 5 milimoles). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas, se  
 5 acidifica a un pH de 1 con HCl 1N, y luego se concentra al vacío. Al residuo se le agrega acetato de etilo. La mezcla se lava con NaOH 1N. Luego la fase acuosa combinada se acidifica y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio, y luego se concentra  
 10 al vacío. La tritución con hexano produce una espuma blanca; p.f. 57-70°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -16.8° (c = 1.032, DMSO); MS(M+H):397.

De una manera similar, se preparan los siguientes:

(b) N-[1-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-ciclopentancarbonil]-O-bencil-L-serina; p.f. 132-136°C (se  
 15 cristaliza a partir de hexano/t-butilmetiléter):

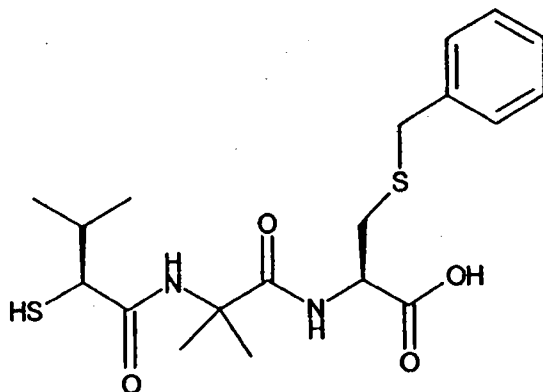


20

(c) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-S-bencil-L-cisteína; p.f. 81-87°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -37.87  
 25 (c = 0.545, DMSO):

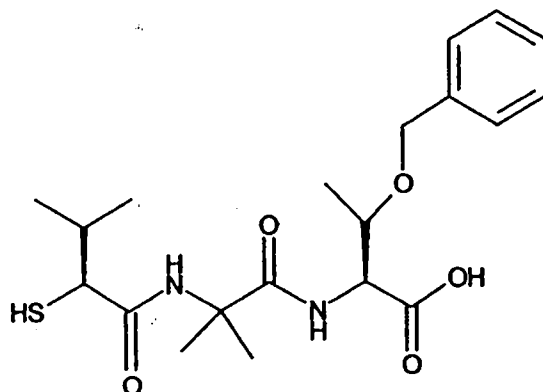
302  
79

5



(d) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-treonina; p.f. 61-64°C:

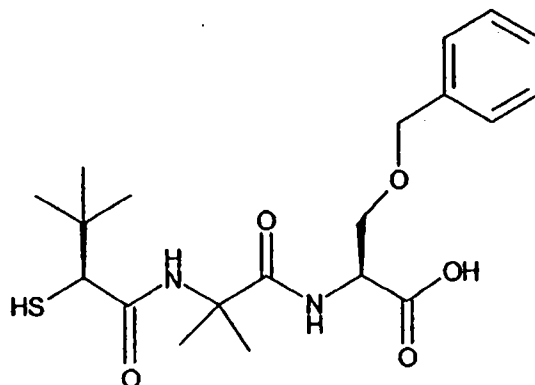
10



15

(e) N-[2-[(S)-2-mercapto-3,3-dimetilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; p.f. 128-130°C;  $[\alpha]_D -2.46$  (c = 1.06, DMSO):

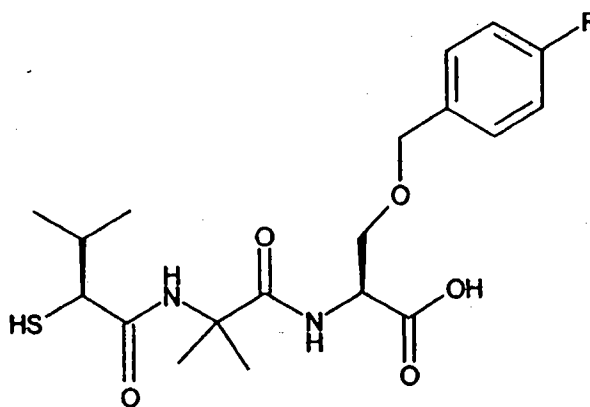
20



25

203  
80

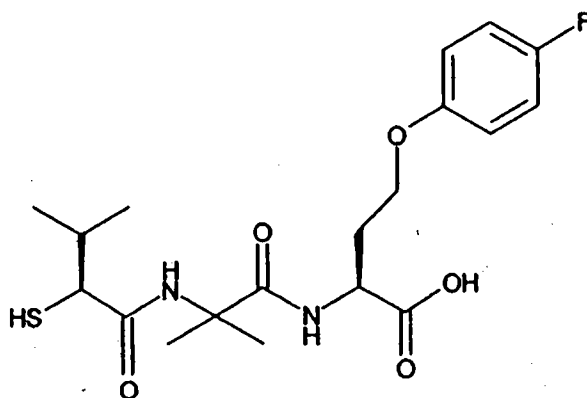
(f) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(4-fluorobencil)-L-serina; p.f. 50-54°C:



5

(g) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(4-fluorofenil)-L-homoserina; p.f. 127-128°C:

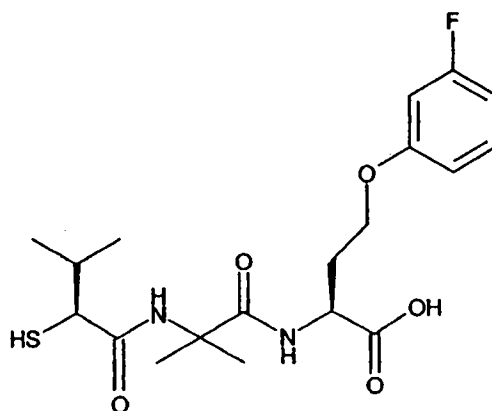
10



15

(h) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-(3-fluorofenil)-L-homoserina; p.f. 50-56°C:

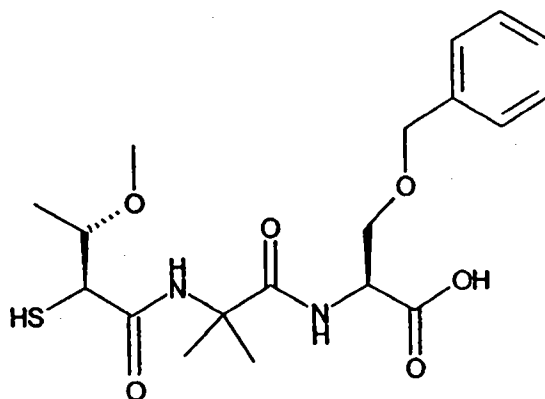
20



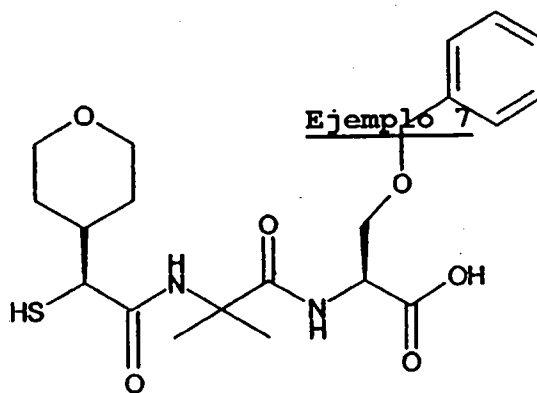
25

304  
81

(i) N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metoxibutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D^{20} +18.85$  (c = 0.997, DMSO):

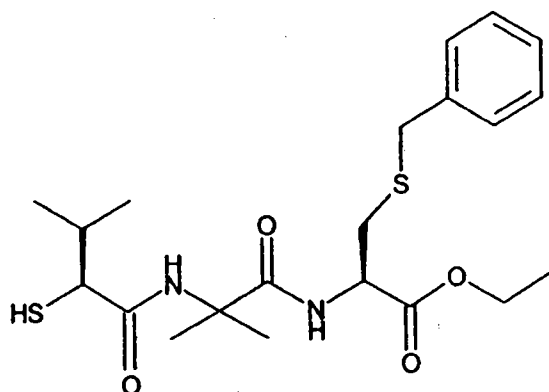


(j) N-[2-[(S)-2-mercapto-2-(4-tetrahidropiranyl)acetilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; p.f. 184-189°C;  $[\alpha]_D^{20} -24.94$  (c = 1.013, DMSO):



### Ejemplo 7

(a) Etiléster de N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-S-bencil-L-cisteína:

305  
82

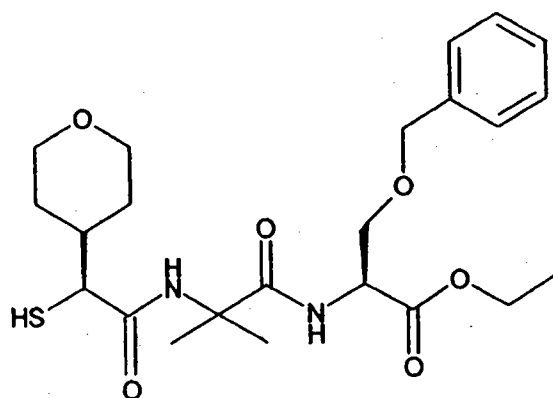
5

Bajo una atmósfera de argón, el compuesto de tioacetilo del Ejemplo 2 (0.48 gramos, 1.0 milimol) se disuelve en EtOH absoluto (5 mililitros), y se trata con NaOH 1N (1.0 mililitro, 1.0 milimol). La mezcla se agita durante 4 horas a temperatura ambiente antes del tratamiento con HCl 1N hasta un pH de 3. La mezcla se evapora para remover la mayor parte del EtOH, y el residuo acuoso se extrae con EtOAc (19 mililitros dos veces). Los extractos combinados se lavan con H<sub>2</sub>O (5 mililitros), y luego con una solución de salmuera (5 mililitros). La solución se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra, y se concentra al vacío. El producto se solidifica a partir de terbutilmetiléter/hexano, para dar el producto; p.f. 87-91°C.

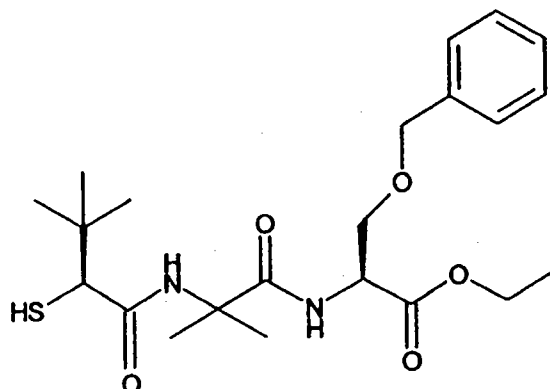
20

(b) De una manera similar, se prepara el etiléter de N-[2-[(S)-2-mercapto-2-(4-tetrahidropiranyl)acetilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; p.f. 85-93°C;  $[\alpha]_D$  -37.21°C (c = 1.012, DMSO):

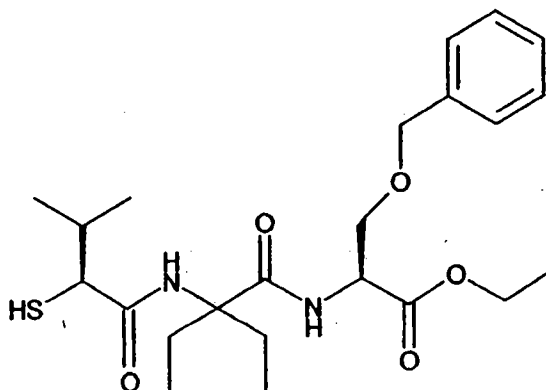
25



(c) De una manera similar se prepara el etiléster de N-[2-[(S)-2-mercapto-3,3-dimetilbutanoilamino]-2-metilpropionil]-O-bencil-L-serina; aceite;  $[\alpha]_D -20.9^\circ$  ( $c = 1.025$ ; DMSO):

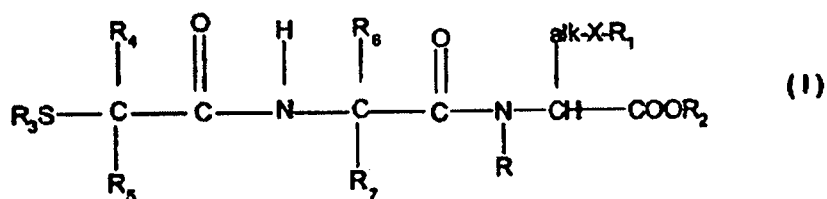


(d) De una manera similar se prepara el etiléster de N-[2-[(S)-2-mercapto-3-metilbutanoilamino]-2-etilbutanoil]-O-bencil-L-serina;  $[\alpha]_D -31.48^\circ$  ( $c = 0.955$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ):



307  
84REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



en donde:

R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno;

R<sub>1</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 5 ó 6 átomos de carbono, arilo carbocíclico o heterocíclico;

alk representa alquileno de 1 a 7 átomos de carbono;

X representa -O- ó -S(O)<sub>n</sub> en donde n es cero ó dos;

R<sub>3</sub> representa hidrógeno o acilo;

R<sub>4</sub> representa hidrógeno, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido, oxacicloalquilo

308  
85

de 3 a 7 átomos de carbono, oxacicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono;

$R_5$  representa hidrógeno o;

$R_4$  y  $R_5$ , combinados con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros de carbonos,

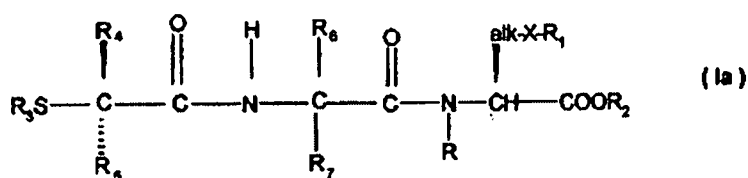
$R_6$  y  $R_7$  junto con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros;

$\text{COOR}_2$  representa carboxilo o carboxilo derivado en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable;

o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la fórmula:

84

309  
86

o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $R$  y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico o heterocíclico,  $R_3$  representa hidrógeno o alcanoilo del a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiraniilo, o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono,

310  
87

y son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico o heterocíclico, R<sub>3</sub> representa hidrógeno o alcanoilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiranyl o alcóxido de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y

311  
88

son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico; en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno; R<sub>3</sub> representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, 4-

312  
89

tetrahidropiraniilo o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcoxicarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico, en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 4 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno;  $R_3$  representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, 4-tetrahidropiraniilo, o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk

3-13  
90

representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcoxycarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y  $\text{R}_5$  representan hidrógeno;  $\text{R}_1$  representa fenilo, fluorofenilo,  $\text{R}_3$  representa hidrógeno, alcanilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanilo de 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcóxido de 1 a 4 átomos de carbono;  $\text{R}_4$  representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropirano;  $\text{R}_6$  y  $\text{R}_7$  representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcoxycarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

341  
91

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo, fluorofenilo, R<sub>3</sub> representa hidrógeno, alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanoilo 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcoxilo 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o alcoxicarbonilo 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, acetilo, o metoxiacetilo; R<sub>4</sub> representa isopropilo o butilo terciario; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o

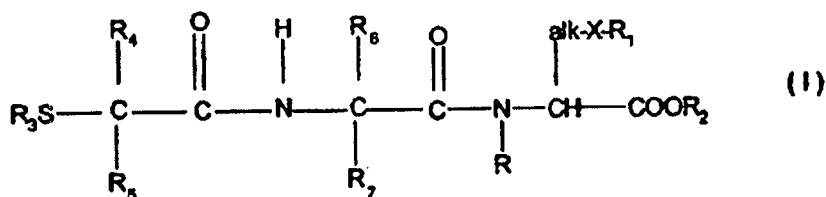
315  
92

etoxicarbonilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de la reivindicación 1 en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

316  
93REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



en donde:

R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno;

R<sub>1</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 5 ó 6 átomos de carbono, arilo carbocíclico o heterocíclico;

alk representa alquileno de 1 a 7 átomos de carbono;

X representa -O- ó -S(O)<sub>n</sub> en donde n es cero ó dos;

R<sub>3</sub> representa hidrógeno o acilo;

R<sub>4</sub> representa hidrógeno, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido, oxacicloalquilo

3/3  
94

de 3 a 7 átomos de carbono, oxacicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono;

$R_5$  representa hidrógeno o; ✓

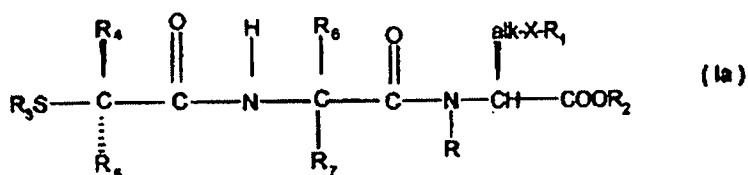
$R_4$  y  $R_5$ , combinados con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros de carbonos, ✓

$R_6$  y  $R_7$  junto con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros; ✓

$\text{COOR}_2$  representa carboxilo o carboxilo derivado en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable; ✓

o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. ✓

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la fórmula:

318  
as

o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $R$  y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico o heterocíclico,  $R_3$  representa hidrógeno o alcanoilo del a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiraniilo, o alcóxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono,

319  
96

y son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico o heterocíclico, R<sub>3</sub> representa hidrógeno o alcanoilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiranyl o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y

320  
97

son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. ✓

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico; en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno; R<sub>3</sub> representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, 4- ✓

32T  
98

tetrahidropiraniilo o alcoxiilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxiilo o alcoxicarboniilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico, en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 4 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxiilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno;  $R_3$  representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, 4-tetrahidropiraniilo, o alcoxiilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk

322  
99

representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcóxicarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. /

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y  $\text{R}_5$  representan hidrógeno;  $\text{R}_1$  representa fenilo, fluorofenilo,  $\text{R}_3$  representa hidrógeno, alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcóxilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $\text{R}_4$  representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo;  $\text{R}_6$  y  $\text{R}_7$  representan metilo;  $\text{X}$  representa -O-; alk representa metileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcóxicarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

323  
100

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo, fluorofenilo, R<sub>3</sub> representa hidrógeno, alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanoilo 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcoxilo 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o alcoxicarbonilo 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, acetilo, o metoxiacetilo; R<sub>4</sub> representa isopropilo o butilo terciario; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o

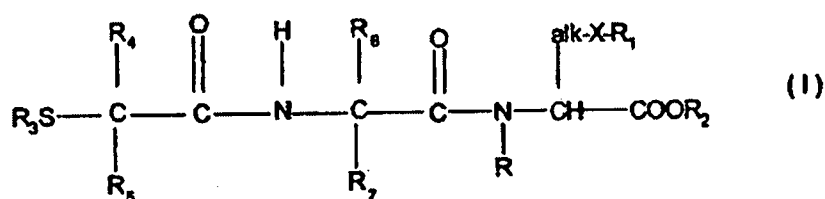
~~329~~  
101

etoxycarbonilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de la reivindicación 1 en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

325  
102REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



en donde:

R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno;

R<sub>1</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 5 ó 6 átomos de carbono, arilo carbocíclico o heterocíclico;

alk representa alquilenos de 1 a 7 átomos de carbono;

X representa -O- ó -S(O)<sub>n</sub> en donde n es cero ó dos;

R<sub>3</sub> representa hidrógeno o acilo;

R<sub>4</sub> representa hidrógeno, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido, oxacicloalquilo

de 3 a 7 átomos de carbono, oxacicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o (arilo carbocíclico o heterocíclico)-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono;

$R_5$  representa hidrógeno o;

$R_4$  y  $R_5$ , combinados con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros de carbonos,

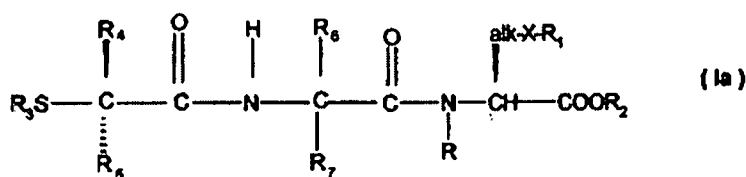
$R_6$  y  $R_7$  junto con el átomo de carbono con el que están unidos, representan cicloalquilideno de 5 ó 6 miembros; ✓

$\text{COOR}_2$  representa carboxilo o carboxilo derivado en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable; ✓

o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. ✓

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la fórmula:

~~327~~  
104



o un derivado de disulfuro que se derive a partir de este compuesto, en donde  $R_3$  es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $R$  y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico o heterocíclico,  $R_3$  representa hidrógeno o alcanoilo del a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiraniilo, o alcóxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono,

328  
105

y son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxicarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxicarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxicarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico o heterocíclico, R<sub>3</sub> representa hidrógeno o alcanoilo de 1 a 7 átomos de carbono opcionalmente sustituido; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, tetrahidropiranyl o alcóxido de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan ambos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y

328  
106

son idénticos; X representa -O- ó -S-; alk representa metileno; COOR<sub>2</sub> representa carboxilo, alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, (dialquil de 1 a 7 átomos de carbono-aminocarbonilo)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono, o (morfolinocarbonil, piperidinocarbonil, o pirrolidinocarbonil)-alcoxycarbonilo de 1 a 7 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa arilo carbocíclico; en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno; R<sub>3</sub> representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, 4-

330  
107

tetrahidropiraniilo o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcoxycarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y  $R_5$  representan hidrógeno;  $R_1$  representa arilo carbocíclico, en donde arilo carbocíclico representa fenilo o fenilo sustituido por uno o dos de hidroxilo, alcanoiloxilo de 1 a 4 átomos de carbono, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometilo, trifluorometoxilo, o halógeno;  $R_3$  representa hidrógeno ó alcanoil de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_4$  representa alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, 4-tetrahidropiraniilo, o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $R_6$  y  $R_7$  representan metilo; X representa -O-; alk

331  
108

representa metileno o etileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcóxicarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R y  $\text{R}_5$  representan hidrógeno;  $\text{R}_1$  representa fenilo, fluorofenilo,  $\text{R}_3$  representa hidrógeno, alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcóxilo de 1 a 4 átomos de carbono;  $\text{R}_4$  representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo;  $\text{R}_6$  y  $\text{R}_7$  representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y  $\text{COOR}_2$  representa carboxilo o alcóxicarbonilo de 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

232  
109

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo, fluorofenilo, R<sub>3</sub> representa hidrógeno, alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcanoilo 1 a 4 átomos de carbono sustituido por alcoxilo 1 a 4 átomos de carbono; R<sub>4</sub> representa isopropilo, butilo terciario, 1-metoxietilo, ó 4-tetrahidropiraniilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o alcoxicarbonilo 1 a 4 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R y R<sub>5</sub> representan hidrógeno; R<sub>1</sub> representa fenilo; R<sub>3</sub> representa hidrógeno, acetilo, o metoxiacetilo; R<sub>4</sub> representa isopropilo o butilo terciario; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan metilo; X representa -O-; alk representa metileno; y COOR<sub>2</sub> representa carboxilo o

333  
110

2610 Rvs DIVI 1

88

etoxicarbonilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de la reivindicación 1 en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/EP 02 / 05293 234

International Application No.

14 MAY 2002 (14. 05. 2002)

International Filing Date

EUROPEAN PATENT OFFICE  
PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) 4 -31996A

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b><br>Dipeptide Derivatives                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Box No. II APPLICANT</b> <input type="checkbox"/> This person is also inventor                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Novartis AG<br>Lichtstrasse 35<br>4056 Basel<br>CH                                                                                                                                                                                                                                                                          | Telephone No.<br>+41 61 324 11 11<br>Facsimile No.<br>+41 61 322 75 32<br>Teleprinter No.<br>Applicant's registration No. with the Office                                                                                                                               |
| State (that is, country) of nationality:<br>CH                                                                                                                                                                                                                                                                              | State (that is, country) of residence:<br>CH                                                                                                                                                                                                                            |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input checked="" type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Novartis-Erfindungen Verwaltungsgesellschaft m.b.H.<br>Brunner Strasse 59<br>1230 Vienna<br>AT                                                                                                                                                                                                                              | This person is:<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant only<br><input type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)<br>Applicant's registration No. with the Office |
| State (that is, country) of nationality:<br>AT                                                                                                                                                                                                                                                                              | State (that is, country) of residence:<br>AT                                                                                                                                                                                                                            |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input checked="" type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| GROS, Florent<br>Novartis AG<br>Corporate Intellectual Property<br>Patent & Trademark Department<br>4002 Basel<br>CH                                                                                                                                                                                                        | Telephone No.<br>+41 61 324 11 11<br>Facsimile No.<br>+41 61 322 75 32<br>Teleprinter No.<br>Agent's registration No. with the Office                                                                                                                                   |
| <input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                         |

325, 112

| Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Name and address:</b> <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br>FINK, Cynthia Anne<br>1 Kensington Court<br>Lebanon, NJ 08833<br>US | <b>This person is:</b><br><br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i><br><br>Applicant's registration No. with the Office |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | State <i>(that is, country)</i> of residence:<br>US                                                                                                                                                                                                                                           |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Name and address:</b> <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br>                                                                    | <b>This person is:</b><br><br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i><br><br>Applicant's registration No. with the Office            |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | State <i>(that is, country)</i> of residence:                                                                                                                                                                                                                                                 |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Name and address:</b> <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br>                                                                    | <b>This person is:</b><br><br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i><br><br>Applicant's registration No. with the Office            |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | State <i>(that is, country)</i> of residence:                                                                                                                                                                                                                                                 |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Name and address:</b> <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br>                                                                    | <b>This person is:</b><br><br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i><br><br>Applicant's registration No. with the Office            |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | State <i>(that is, country)</i> of residence:                                                                                                                                                                                                                                                 |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

111

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☐ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
- ☒ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |                                                                           |                                                                                  |                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates               | <input type="checkbox"/> GM Gambia                                               | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand              |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda                | <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia                                   | <input checked="" type="checkbox"/> OM Oman                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania                            | <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary                                   | <input checked="" type="checkbox"/> PH Philippines              |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia                            | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia                                 | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria                            | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel                                    | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia                          | <input checked="" type="checkbox"/> IN India                                     | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan                         | <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland                                   | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina             | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                                     | <input type="checkbox"/> SD Sudan                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados                           | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria                           | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan                                | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore                |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil                             | <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea     | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus                            | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea                         | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize                             | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                                | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                             | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia                               | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                 | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan             |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China                              | <input type="checkbox"/> LR Liberia                                              | <input checked="" type="checkbox"/> TN Tunisia                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CO Colombia                           | <input type="checkbox"/> LS Lesotho                                              | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica                         | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania                                 | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba                               | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg                                | <input type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania         |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic                     | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia                                    | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany                            | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco                                   | <input type="checkbox"/> UG Uganda                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark                            | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova                       | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica                           | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                                           | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan               |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria                            | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> EC Ecuador                            | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia                                  | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia               |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia                            | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                               | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa             |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain                              | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico                                    | <input type="checkbox"/> ZM Zambia                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland                            | <input type="checkbox"/> MZ Mozambique                                           | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom                     | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway                                    |                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada                            |                                                                                  |                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia                            |                                                                                  |                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana                              |                                                                                  |                                                                 |

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

## Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

## Continuation of Box No. II

Novartis AG is applicant for all designated States with the exception of: AT (Austria) and US (USA)

- (i) if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

## Continuation of Box No. III

Novartis-Erfindungen Verwaltungsgesellschaft m.b.H. is applicant for AT (Austria) only.

- (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

- (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

- (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

- (v) if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;

- (vi) if, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

| <b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| Filing date<br>of earlier application<br>(day/month/year)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Number<br>of earlier application                                                                                                     | Where earlier application is:    |                                           |                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                      | national application:<br>country | regional application:*<br>regional Office | international application:<br>receiving Office |
| item (1)<br>15 May 2001<br>(15.05.01)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60/291,088                                                                                                                           | US                               |                                           |                                                |
| item (2)<br>11 December 2001<br>(11.12.01)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 60/339,575                                                                                                                           | US                               |                                           |                                                |
| item (3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| item (4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| item (5)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| <input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:<br><input type="checkbox"/> all items <input type="checkbox"/> item (1) <input type="checkbox"/> item (2) <input type="checkbox"/> item (3) <input type="checkbox"/> item (4) <input type="checkbox"/> item (5) <input type="checkbox"/> other, see Supplemental Box |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| * Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)): .....                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| <b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):<br>ISA / .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):<br>Date (day/month/year)                      Number                      Country (or regional Office)                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| <b>Box No. VIII DECLARATIONS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                      |                                  |                                           |                                                |
| The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                      |                                  |                                           | Number of<br>declarations                      |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Declaration as to the identity of the inventor                                                                                       |                                  |                                           | :                                              |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent             |                                  |                                           | :                                              |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application |                                  |                                           | :                                              |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)                               |                                  |                                           | :                                              |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty                                                       |                                  |                                           | :                                              |

## Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

| This international application contains:                                                                                                                                             | This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):                                              | Number of items |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| (a) the following number of sheets in paper form:                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                   |                 |
| request (including declaration sheets) : 6                                                                                                                                           | 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet                                                                                                                                                      | 1               |
| description (excluding sequence listing part) : 47                                                                                                                                   | 2. <input checked="" type="checkbox"/> original separate power of attorney                                                                                                                                        | 1               |
| claims : 4                                                                                                                                                                           | 3. <input type="checkbox"/> original general power of attorney                                                                                                                                                    |                 |
| abstract : 1                                                                                                                                                                         | 4. <input checked="" type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: AV. 36671 + 37586                                                                                             | 2               |
| drawings : --                                                                                                                                                                        | 5. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature                                                                                                                                                |                 |
| Sub-total number of sheets : 58                                                                                                                                                      | 6. <input checked="" type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): (1) + (2)                                                                                                        | 2               |
| sequence listing part of description (actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below) : --                       | 7. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language):                                                                                                                             |                 |
| Total number of sheets : 58                                                                                                                                                          | 8. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material                                                                                                  |                 |
| (b) sequence listing part of description filed in computer readable form                                                                                                             | 9. <input type="checkbox"/> sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))                                                              |                 |
| (i) <input type="checkbox"/> only (under Section 801(a)(i))                                                                                                                          | (i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)                                                     |                 |
| (ii) <input type="checkbox"/> in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))                                                                                    | (ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter |                 |
| Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column): | (iii) <input type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column                                                  |                 |
| Figure of the drawings which should accompany the abstract: ---                                                                                                                      | 10. <input type="checkbox"/> other (specify):                                                                                                                                                                     |                 |
| Language of filing of the international application: English                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                   |                 |

## Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

In the name of the applicants  
The representative

25.04.2002

GROS, Florent AV 36671 + 37586

For receiving Office use only

|                                                                                                                                             |                                                                                         |                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Date of actual receipt of the purported international application:                                                                       | 14 MAY 2002 (14.05.02)                                                                  | 2. Drawings:<br><input type="checkbox"/> received:<br><br><input type="checkbox"/> not received: |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: |                                                                                         |                                                                                                  |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):                                                              |                                                                                         |                                                                                                  |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /                                                                  | 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid |                                                                                                  |

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau:

Y Corporate Intellectual Property

13. Dez. 2002

**PCT**

APP ☐ INT ☐ AL ☐ PS ☐ Copy: ☐

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:  
NOVARTIS AG  
Corporate Intellectual Property  
Attn. Gros, Florent  
Patent & Trademark Department  
CH-4002 Basel  
SWITZERLAND

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

|                                                   |                                                          |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Date of mailing<br>(day/month/year)               | 13/12/2002                                               |
| Applicant's or agent's file reference<br>4-31996A | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See paragraphs 1 and 4 below   |
| International application No.<br>PCT/EP 02/ 05293 | International filing date<br>(day/month/year) 14/05/2002 |
| Applicant<br>NOVARTIS AG                          |                                                          |

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

**Filing of amendments and statement under Article 19:**

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

**When?** The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

**For more detailed instructions,** see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Further action(s):** The applicant is reminded of the following:

Shortly after **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within **19 months** from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within **20 months** from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bruno Danti

## NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

### INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

#### What parts of the International application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

#### When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

#### Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

#### How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

#### What documents must/may accompany the amendments?

##### Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

344  
118

117

342  
119

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:  
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:  
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:  
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or  
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:  
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

#### "Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

#### Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

#### Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (TCP)

OMPI

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| (19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual<br>Oficina Internacional                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | TCP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (10) Número de la Publicación Internacional:<br>WO 02/092622 A3 |
| (43) Fecha de la Publicación Internacional:<br>21 de noviembre de 2002 (21.11.2002)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (51) Clasificación de Patente Internacional <sup>7</sup> : C07K 5/06,<br>A61P 9/12, A61K 38/04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | (74) Agente: GROS, Florent; Novartis AG, Corporación de<br>Propiedad Intelectual, Departamento de Patentes y Marcas,<br>CH-4002 Basel (CH).                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                 |
| (21) Número de Solicitud Internacional:<br>PCT/EP02/05293                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (81) Estados Designados (nacionales):<br>AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,<br>BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,<br>EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS,<br>JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD,<br>MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE,<br>SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU,<br>ZA, ZW. |                                                                 |
| (22) Fecha de Presentación Internacional:<br>14 de mayo 2002 (14.05.2002)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (84) Estados Designados (regionales):<br>Patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,<br>TM), Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,<br>FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).                                                                                                                                                                             |                                                                 |
| (25) Idioma de Presentación:<br>Inglés                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Publicado:<br>Con reporte de búsqueda internacional                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                 |
| (26) Idioma de Publicación:<br>Inglés                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional<br>10 de abril de 2003                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                 |
| (30) Información de Prioridad:<br>60/291,088 15 de mayo 2001 (15.05.2001) US<br>60/339,575 11 de diciembre de 2001 (11.12.2001) US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a las<br>"Notas de Guía sobre códigos y abreviaturas" que aparecen al<br>principio de cada publicación regular de la gaceta del TCP.                                                                                                                                                                                |                                                                 |
| (71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto AT,<br>US): NOVARTIS AG [CH/CH]: Lichtstrasse 35, CH-4056<br>Basel (CH).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto AT):<br>NOVARTIS-ERFINDUNGEN<br>VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]:<br>Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (72) Inventores; y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (75) Inventores/Solicitantes (solo para US): FINK, Cynthia,<br>Anne [US/US]: 1 Kensington Court, Lebanon, NJ 08833 (US).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (54) Título: DERIVADOS DE DIPEPTIDO QUE TIENEN UN GRUPO 2-TIOACILO N-TERMINAL<br>COMO INHIBIDORES DE VASOPEPTIDASA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |
| (57) Resumen:<br><br>Compuestos de la fórmula I en donde R, R1, COOR2, R3-R7, alk, y X tienen los significados como se definen,<br>siendo éstos útiles como inhibidores dobles de la enzima convertidora de angiotensina y de la endopeptidasa neutra,<br>así como inhibidores de la enzima convertidora de endotelina. En una modalidad preferida R y R5 representan<br>hidrógeno; R1 representa bencilo; R3 representa hidrógeno, acetilo o metoxiacetilo; R4 representa isopropilo o<br>butilo terciario; R6 y R7 representan metilo; X representa - O-; alk representa metileno; y COOR2 representa<br>carboxilo o etoxicarbonilo |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                 |

WO 02/092622 A3

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/092622 A2

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C07K 5/00 (74) Agent: GROS, Florent; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/05293 ✓
- (22) International Filing Date: 14 May 2002 (14.05.2002) ✓ (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: ✓  
60/291,088 ✓ 15 May 2001 (15.05.2001) US ✓  
60/339,575 ✓ / 11 December 2001 (11.12.2001) US ✓
- (71) Applicant (for all designated States except AT, US): NO-VARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH). ✓
- (71) Applicant (for all designated States except AT): NO-VARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): FINK, Cynthia, Anne [US/US]; 1 Kensington Court, Lebanon, NJ 08833 (US).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that 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: DIPEPTIDE DERIVATIVES

(57) Abstract: Compounds of the formula [formula] wherein  $R_1, R_2, COOR_2, R_7$ , and  $x$  have meaning as defined, such being useful as dual inhibitors of angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase, as well as inhibitors of endothelin converting enzyme.

WO 02/092622 A2

345  
122

4-319961A

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 November 2002 (21.11.2002) ✓

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/092622 A3 ✓

(51) International Patent Classification?: C07K 5/06.  
A61P 9/12, A61K 38/04

(74) Agent: GROS, Florent; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).

(21) International Application Number: PCT/EP02/05293 ✓

(22) International Filing Date: 14 May 2002 (14.05.2002) ✓

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Priority Data:  
60/291,088 15 May 2001 (15.05.2001) US ✓  
60/339,575 11 December 2001 (11.12.2001) US ✓

(84) Designated States (*regional*): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Applicant (*for all designated States except AT, US*): NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

Published:  
— with international search report

(71) Applicant (*for all designated States except AT*): NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

(88) Date of publication of the international search report:  
10 April 2003

(72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (*for US only*): FINK, Cynthia, Anne [US/US]; 1 Kensington Court, Lebanon, NJ 08833 (US).

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.



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                          |                                                                                                                                                         |                                                                |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>4-31996A</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/EP 02/05293</b>  | International filing date (day/month/year)<br><b>14/05/2002</b>                                                                                         | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>15/05/2001</b> |
| Applicant<br><b>NOVARTIS AG</b>                          |                                                                                                                                                         |                                                                |

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, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the **title**,

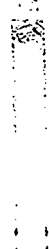
- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

DIPEPTIDE DERIVATIVES HAVING A N-TERMINAL 2-THIOACYL GROUP AS VASOPEPTIDASE INHIBITORS

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 III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

## 6. The figure of the drawing to be published with the abstract is Figure No.



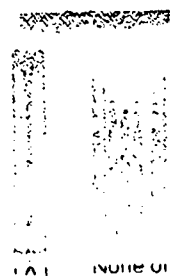
as suggested by the applicant.



as suggested by the applicant.



because the figure does not contain any information.



None of the figures.



None of the figures.

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                          |                                                                                                                                                         |                                                                |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>4-31996A</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/EP 02/ 05293</b> | International filing date (day/month/year)<br><b>14/05/2002</b>                                                                                         | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>15/05/2001</b> |
| Applicant<br><b>NOVARTIS AG</b>                          |                                                                                                                                                         |                                                                |

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, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

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:

**DIPEPTIDE DERIVATIVES HAVING A N-TERMINAL 2-THIOACYL GROUP AS VASOPEPTIDASE INHIBITORS**

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 III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

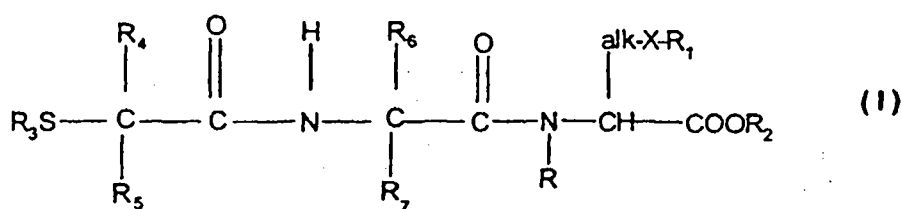
☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

ABSTRACT OF THE INVENTION

Compounds of the formula



wherein R, R<sub>1</sub>, COOR<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>-R<sub>7</sub>, alk, and X have meaning as defined, such being useful as dual inhibitors of angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase, as well as inhibitors of endothelin converting enzyme.

In a preferred embodiment,

~~11. A compound according to claim 10 wherein~~ R and R<sub>5</sub> represent hydrogen; R<sub>1</sub> represents benzyl; R<sub>3</sub> represents hydrogen, acetyl or methoxyacetyl; R<sub>4</sub> represents isopropyl or *tert*-butyl; R<sub>6</sub> and R<sub>7</sub> represent methyl; X represents -O-; alk represents methylene; and COOR<sub>2</sub> represents carboxyl or ethoxycarbonyl; ~~or a pharmaceutically acceptable salt thereof.~~

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/05293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K5/06 A61P9/12 A61K38/04349  
126

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 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | CORIC ET AL: "Optimal recognition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme active sites by mercaptoacyldipeptides as a means to design potent dual inhibitors"<br>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 39, no. 6, 1996, pages 1210-1219, XP002092013<br>ISSN: 0022-2623 | 1,2,<br>12-15         |
| Y          | abstract; page 1211, paragraph joining left- and right-hand columns; table 1, in particular compounds 3 and 4<br>---<br>-/--                                                                                                                                                                                                         | 3-11                  |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2002

Date of mailing of the international search report

13/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-2040

Authorized officer

E. J. J. J. J.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/05293

350,12.7

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| X          | US 5 591 891 A (ROQUES BERNARD-PIERRE ET AL) 7 January 1997 (1997-01-07)<br>column 8, lines 1-36; column 9, lines 13-18; compounds of table I on columns 13 and 14, line 9; column 15, line 55 - column 16, line 40; column 17, lines 9-11; column 18, line 64 -column 19, line 9; table III<br>-----                                                  | 1,2,<br>12-15        |
| Y          | ROBL J A ET AL: "Recent advances in the design and development of vasopeptidase inhibitors"<br>EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, ASHLEY PUBLICATIONS, GB, vol. 9, no. 12, 1999, pages 1665-1677, XP002203837<br>ISSN: 1354-3776<br>abstract; page 1670, right-hand column, lines 36-40; compounds 1-30, in particular compounds 9 and 28<br>----- | 3-11                 |
| A          | WO 99 55726 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); FINK CYNTHIA ANNE) 4 November 1999 (1999-11-04)<br>cited in the application<br>abstract; page 12, lines 14-18;<br>claim 1; examples 6P,12F<br>-----                                                                                                                                     | 1-15                 |
| A          | WO 99 19346 A (HERGENROEDER STEFAN ;BASF AG (DE); KLING ANDREAS (DE); AMBERG WILH) 22 April 1999 (1999-04-22)<br>abstract; claim 1; examples 1,2<br>-----                                                                                                                                                                                              | 1-15                 |

357,128

International Application No. PCT/EP 02 05293

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 12-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 12-14

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/05293

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5591891                                | A | 07-01-1997          | FR 2679564 A1              | 29-01-1993          |
|                                           |   |                     | AU 2326892 A               | 23-02-1993          |
|                                           |   |                     | CA 2113358 A1              | 04-02-1993          |
|                                           |   |                     | WO 9302099 A1              | 04-02-1993          |
|                                           |   |                     | EP 0524553 A1              | 27-01-1993          |
|                                           |   |                     | EP 0595878 A1              | 11-05-1994          |
|                                           |   |                     | JP 6509335 T               | 20-10-1994          |
|                                           |   |                     | US 5801274 A               | 01-09-1998          |
|                                           |   |                     | MX 9204301 A1              | 01-03-1993          |
| WO 9955726                                | A | 04-11-1999          | AU 3819999 A               | 16-11-1999          |
|                                           |   |                     | BR 9909805 A               | 26-12-2000          |
|                                           |   |                     | CA 2323691 A1              | 04-11-1999          |
|                                           |   |                     | CN 1297453 T               | 30-05-2001          |
|                                           |   |                     | WO 9955726 A1              | 04-11-1999          |
|                                           |   |                     | EP 1073674 A1              | 07-02-2001          |
|                                           |   |                     | HU 0101640 A2              | 28-09-2001          |
|                                           |   |                     | JP 2002513032 T            | 08-05-2002          |
|                                           |   |                     | NO 20005293 A              | 18-12-2000          |
|                                           |   |                     | PL 343594 A1               | 27-08-2001          |
|                                           |   |                     | SK 15812000 A3             | 12-03-2001          |
| WO 9919346                                | A | 22-04-1999          | DE 19745151 A1             | 15-04-1999          |
|                                           |   |                     | AU 9626498 A               | 03-05-1999          |
|                                           |   |                     | WO 9919346 A1              | 22-04-1999          |
|                                           |   |                     | EP 1023318 A1              | 02-08-2000          |
|                                           |   |                     | JP 2001519440 T            | 23-10-2001          |
|                                           |   |                     | ZA 9809313 A               | 13-04-2000          |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 02/05293

383  
150

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 12-14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

131  
384

**TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES**  
**PCT**  
**INFORME EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL**  
**(PCT artículo 36 y regla 70)**

|                                                                                          |                                                                                                                 |                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Referencia del solicitante o agente<br>4-31996A                                          | Ver notificación de la transmisión del examen preliminar Internacional (formato PCT/IPEA/416)<br>PARA PROSEGUIR |                                                |
| No. Solicitud Internacional<br>PCT/EP 02/05293                                           | Fecha de presentación internacional (día/mes/año)<br>14/05/2002                                                 | Fecha de prioridad (día/mes/año)<br>15/05/2001 |
| Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC<br>C07k5/06 |                                                                                                                 |                                                |
| Solicitante<br>NOVARTIS AG. et al                                                        |                                                                                                                 |                                                |

1. Este examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad encargada del Examen Preliminar Internacional y es transmitida al solicitante de acuerdo con el artículo 36.
2. Este INFORME consiste de un total de 2 páginas, incluyendo esta hoja.
- Este informe también está acompañado por ANEXOS, esto es hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos, los cuales han sido modificados y son la base para este informe y/o hojas que contienen rectificaciones presentadas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas bajo el PCT).

Estos anexos consisten en un total de \_\_ hojas.

3. Este informe contiene indicaciones que se relacionan con los siguientes puntos:

- I. ☒ Base del Informe
- II. ☐ Prioridad
- III. ☐ El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial
- IV. ☐ Falta de unidad de invención
- V. ☒ Declaración motivada bajo el Art. 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración
- VI. ☐ Ciertos documentos citados
- VII. ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
- VIII. ☐ Ciertas observaciones en la solicitud internacional

|                                                                                   |                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Fecha de presentación de la demanda<br>03/12/2002                                 | Fecha en que se completó este informe<br>16.04.2003 |
| Nombre y dirección de la autoridad encargada del examen preliminar internacional: | Oficial autorizado                                  |

# INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud internacional No. PCT/EP 02/05293

358,132

## I. BASE DEL INFORME

La base de este examen preliminar internacional es la solicitud como originalmente fue presentada.

## III. El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

1. La pregunta de si la presente invención reivindicada aparenta ser novedosa, si tiene altura inventiva, o es aplicable industrialmente no ha sido materia del examen preliminar internacional en relación con las reivindicaciones que no han sido buscadas (Artículo 17(2) (a) o (3) y regla 66.1 (e) del PCT); ver también reporte de búsqueda internacional).

## V. Declaración motivada bajo la Regla 66.2 (a) (ii) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha declaración

Bajo el entendido de que el examen preliminar internacional ha sido llevado a cabo (ver ítem III), se señala lo siguiente:

A la luz de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, se considera que la invención como es definida por algunas de las reivindicaciones, que han sido objeto de un examen de búsqueda internacional, no parecen cumplir con el criterio mencionado en el artículo 33 (1) del PCT, esto es que no parecen tener novedad y/o altura inventiva (ver reporte de búsqueda internacional, en particular los documentos citados X y Y, y la correspondiente referencia a la reivindicación).



134  
357**I. Base del informe**

1. La base de esta opinión escrita es la solicitud de patente como fue presentada originalmente.

**III. El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial**

La pregunta de si la presente invención reivindicada aparenta ser novedosa, si tiene altura inventiva, o es aplicable industrialmente no ha sido ni será materia del examen preliminar internacional en relación con las reivindicaciones respecto de las cuales no se ha realizado la búsqueda (Art. 17 (2) (a) y regla 66.1 (e) del PCT; ver también el informe de búsqueda internacional).

**V. Declaración motivada conforme a la Regla 66.2 (a)(ii) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial**

1. Si fuera llevado a cabo el examen internacional preliminar (ver el punto III), se señala lo siguiente:
2. A la luz de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional, se considera que la invención, tal como es definida por lo menos por algunas de las reivindicaciones, las cuales han sido objeto del reporte de búsqueda internacional, parecen no cumplir con los criterios mencionados en el artículo 33(1) del PCT, esto es que parece no tener novedad o nivel inventivo (ver reporte de búsqueda internacional, en particular los documentos citados como X y/o Y y las correspondientes referencias de las reivindicaciones).
3. Si se presentan modificaciones, el solicitante debe cumplir con los requisitos de la regla 66.8 del PCT e indicar el fundamento de las modificaciones en los documentos de la solicitud como originalmente fueron presentados (artículo 34 (2) (b) del PCT), de lo contrario las modificaciones no deberán ser tenidas en cuenta para el establecimiento del reporte de examen preliminar. Se resalta el hecho al solicitante de que si la solicitud contiene un número innecesario de reivindicaciones independientes, ningún examen se llevará a cabo respecto de las reivindicaciones.

NB: Si el solicitante decide pedir un examen de fondo detallado, el reporte de un examen preliminar internacional será establecido normal y directamente. Excepcionalmente, el examinador podrá emitir una segunda opinión escrita, lo cual deberá ser explícitamente solicitado.

# PATENT COOPERATION TREATY

Corporate Intellectual Property

- 3. März 2003

APPL. M.D. F/L PS Copy:

PCT

HORITY

GROS, Florent  
Novartis AG  
Corporate Intellectual Property  
Patent & Trademark Department  
CH-4002 Basel  
SUISSE

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

35/135

Date of mailing  
(day/month/year) 28/02/2003

Applicant's or agent's file reference  
4-31996A

REPLY DUE  
within 1 / 00 months/days  
from the above date of mailing

|                                                   |                                                          |                                              |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| International application No.<br>PCT/EP 02/ 05293 | International filing date (day/month/year)<br>14/05/2002 | Priority date (day/month/year)<br>15/05/2001 |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
C07K5/06

Applicant  
NOVARTIS AG et al.

- This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.
- This opinion contains indications relating to the following items:
  - ☒ Basis of the opinion
  - ☐ Priority
  - ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
  - ☐ Lack of unity of invention
  - ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
  - ☐ Certain documents cited
  - ☐ Certain defects in the international application
  - ☐ Certain observations on the international application
- The applicant is hereby invited to reply to this opinion.
 

**When?** See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

**How?** By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

**Also** For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.  
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis.  
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

- The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 15/09/2003

Name and mailing address of the IPEA/

 European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d  
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

Examiner

Formalities officer  
(incl. extension of time limits)  
Tel. (+49-89) 2399 2828



**I. Basis of the opinion**

The basis of this written opinion is the application as originally filed.

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT; see also international search report).

**V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability**

1. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:
2. In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).
3. If amendments are filed, the applicant should comply with the requirements of Rule 66.8 PCT and indicate the basis of the amendments in the documents of the application as originally filed (Article 34 (2) (b) PCT) otherwise these amendments may not be taken into consideration for the establishment of the international preliminary examination report. The attention of the applicant is drawn to the fact that if the application contains an unnecessary plurality of independent claims, no examination of any of the claims will be carried out.

NB: Should the applicant decide to request detailed substantive examination, then an international preliminary examination report will normally be established directly. Exceptionally the examiner may draw up a second written opinion, should this be explicitly requested.

25. Nov. 2003

## PATENT COOPERATION TREATY

App. M/D F/L PS Copy

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

GROS, Florent  
Novartis AG  
Corporate Intellectual Property  
Patent & Trademark Department  
CH-4002 Basel  
SUISSE

COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH  
NO OTHER FORM IS APPLICABLE

Date of mailing (day/month/year)

19 November 2003 (19.11.03)

Applicant's or agent's file reference

4-31996A

REPLY DUE

see paragraph 1 below

International application No.

PCT/EP02/05293

International filing date (day/month/year)

14 May 2002 (14.05.02)

Applicant

NOVARTIS AG

1. ☐ REPLY DUE within \_\_\_\_\_ months/days from the above date of mailing☒ NO REPLY DUE, however, see below☐ IMPORTANT COMMUNICATION☒ INFORMATION ONLY

2. COMMUNICATION:

The International Bureau acknowledges receipt of your letter dated 10 November 2003 regarding the the second applicant for the above mentioned international application

Due to a clerical error, former NOVERTIS ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT MBH (now NOVERTIS PHARMA GMBH) was incorrectly indicated as applicant for all designated states except AT instead of applicant for AT only upon international publication.

This error has now been corrected.

The International Bureau apologizes for any inconvenience this error may have caused and informs the applicant that a republication will take place as soon as possible.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338-7080

Authorized officer

Kari HUYNH-KHUONG (Fax : 338 89 75)

Telephone No. (41-22) 338.97.80









142

142

TABLE II-continued

| Example | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>                  | R <sub>3</sub>                   | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> |
|---------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| 43      |                 | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>  | H              |                |
| 44      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                                  | H              |                |
| 45      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 |                                  | H              |                |
| 46      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 |                                  |                |                |
| 47      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                                  | H              |                |
| 48      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | H                                |                |                |
| 49      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                                  |                |                |
| 50      |                 |                                 |                                  | H              |                |
| 51      |                 | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                  | H              |                |
| 52      |                 | CH <sub>3</sub>                 |                                  | H              |                |
| 53      |                 | CH <sub>3</sub>                 | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | H              |                |

Selected pharmacological data for certain preferred compounds of the present invention are presented in Table III below.

TABLE III

| Inhibitory Effect on NEP and ACE |                           | Inhibitory Effect on NEP and ACE |                           |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Example                          | EC <sub>50</sub> (nM) NEP | Example                          | EC <sub>50</sub> (nM) ACE |
| 19                               | 5 ± 2                     | 25                               | 5 ± 2                     |
| 20                               | 12 ± 0.5                  | 26                               | 10 ± 1                    |
| 21                               | 18 ± 2                    | 27                               | 15 ± 0.5                  |
| 22                               | 18 ± 2                    | 28                               | 15 ± 0.5                  |
| 23                               | 3 ± 2                     |                                  |                           |
| 24                               | 3 ± 1                     |                                  |                           |

Methods for the Preparation of Compounds Which are the Subject Matter of International Application No. 2

the ACE inhibitory activity of various compounds of the invention.

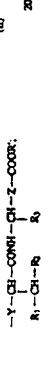
We claim:  
1. An S-lipophilic aliphatic carbonyl (N-mercaptoacyl, (amino acid or peptide) compound.  
2. A process for preparing the compound according to claim 1, comprising reacting an S-lipophilic aliphatic carbonyl compound with a lipophilic aliphatic carbonyl compound or peptide) with a lipophilic aliphatic carbonyl compound according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

4. A compound of the formula



wherein:

X is a residue of the formula



R<sub>1</sub> is a chemical bond or -CH<sub>2</sub>-

Z is a chemical single bond or



R<sub>2</sub> is hydrogen, aryl, aryl, cycloalkyl, carbonyl, lipophilic aliphatic carbonyl or -S-X;

R<sub>3</sub> is hydrogen or alkyl;

R<sub>4</sub> is hydrogen, alkyl, aryl, heterocyclic, aryl, alkoxy, alkoxy-lower alkyl, or aralkoxy;

R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are also linked together to form aryl, when R<sub>5</sub> is aryl, heterocyclic, aryl, or aralkoxy, R<sub>6</sub> is also alkylene which is linked to R<sub>5</sub> to form fused aromatic cycloalkyl;

R<sub>7</sub> is hydrogen, alkyl, aryl, alkoxy, aralkoxy or -CH<sub>2</sub>OR<sub>8</sub> (R<sub>8</sub>), where R<sub>8</sub> has the same definition as R<sub>2</sub>, and R<sub>7</sub> has the same definition as R<sub>2</sub>;

R<sub>9</sub> is hydrogen or alkyl;

R<sub>10</sub> is cycloalkyl, aryl, aryl, aralkoxy-lower alkyl or alkoxy-lower alkyl;

R<sub>11</sub> and R<sub>12</sub> are also linked together to form together with the nitrogen and carbon atoms to which R<sub>11</sub> and R<sub>12</sub> are respectively attached, heterocyclic;

R<sub>13</sub> is hydrogen, alkyl, aryl, aryl, aryl or lipophilic aliphatic carbonyl, with the proviso that when R<sub>13</sub> is hydrogen or alkyl, R<sub>14</sub> is -CH<sub>2</sub>OR<sub>15</sub> where R<sub>15</sub> is hydrogen or alkyl, or R<sub>14</sub> is -CH<sub>2</sub>OR<sub>16</sub> where R<sub>16</sub> is hydrogen or alkyl, and R<sub>15</sub> and R<sub>16</sub> are also linked together to form together with the nitrogen and carbon atoms to which R<sub>15</sub> and R<sub>16</sub> are respectively attached, heterocyclic; hydroxy, aralkoxy, aralkoxy, or thioalkoxy, then R<sub>17</sub> is not hydrogen, alkyl or 1 to 5 carbon atoms, unsubstituted phenyl or substituted phenyl;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5. The compound according to claim 4 wherein:

Y is -CH<sub>2</sub>-

Z is a chemical single bond;

R<sub>2</sub> is hydrogen, aryl, aryl, cycloalkyl, carbonyl or -S-X;

R<sub>1</sub> is alkyl;

R<sub>2</sub> is aryl or heterocyclic;

R<sub>3</sub> is also alkylene which is linked to a carbon atom of R<sub>2</sub> that is at a position which is ortho to the point of attachment of R<sub>2</sub> to the methine (CH) group.

R<sub>4</sub> is hydrogen, alkyl, aryl, heterocyclic, alkoxy or aralkoxy, and

R<sub>5</sub> is hydrogen, alkyl, aryl, aryl, or aryl.

6. The compound according to claim 5 wherein:

R<sub>6</sub> is hydrogen, aryl, benzoyl to which the phenyl ring is unsubstituted or substituted with halogen, hydroxy, alkoxy, amino, dialkylamino or trialkylamino, aryl, aralkoxy, palmitoyl, stearyl or -S-X;

R<sub>7</sub> is methyl or trifluoromethyl;

R<sub>8</sub> is phenyl or heterocyclic which is 2-, 3- or 4-aryl, (A) said phenyl or heterocyclic is substituted or substituted with one or more substituents at a position other than the position which is ortho to the point of attachment of R<sub>8</sub> to the methine (CH) group, said substituents being independently halo, hydroxy, aryl, alkoxy, phenoxyl, phenylthio, amino, dialkylamino, methylamino, ethylamino, or

(B) said phenyl or heterocyclic is connected to R<sub>9</sub> which is alkylene and which is linked to a carbon atom of R<sub>10</sub> at a position that is ortho to the point of attachment of R<sub>10</sub> to the methine (CH) group, said alkylene being unsubstituted or substituted with methyl, and wherein said alkylene may contain also, in the allylene chain, one or more -W-CH<sub>2</sub>- or -CH<sub>2</sub>-W- radicals, wherein W is -N(CH<sub>3</sub>)-;

R<sub>11</sub> is hydrogen, trifluoromethyl, alkyl which is substituted or unsubstituted, alkoxy, phenoxyl or aryl, said alkyl substituents being independently phenyl, hydroxy, alkoxy, phenoxyl, alkylthio, phenylthio, benzoyl or benzylthio, and wherein phenyl and aryl, and the phenyl portions of phenoxyl, phenylthio, benzoyl and benzylthio, are unsubstituted or substituted with one or more of halo, hydroxy, alkoxy, amino, dialkylamino, methylamino, ethylamino, or

R<sub>12</sub> is hydrogen, methyl, ethyl, benzyl, cyclohexylmethyl, palmitoyl or stearyl;

7. The compound according to claim 5 which is selected from the group consisting of:

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutylthreonine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutylglycine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-histidine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-alanine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-serine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-threonine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-proline;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-tyrosine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-isoleucine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-valine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-methionine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-cysteine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-homocysteine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-homoserine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-homocystine;

N-(2-acylthiomethyl)-1-oxo-3-phenylbutyl-L-homocystine;

N-[2-mercapto-2-(1-indanyl)-1-oxopropyl]alanine;  
N-[2-mercaptoethyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxobutyl  
alanine; and  
N-[2-(1-mercaptoethyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxobutyl]lysine.  
5  
9. The compound according to claim 8 which is N-[(2S,3R)-2-mercaptoethyl]-1-oxo-3-phenyl-L-prol-L-alanine.  
10. The compound according to claim 5 wherein the stereochemical configuration of the carbon atoms which are designated with asterisks is selected from the group consisting of R,R,S, S,R,S, S,S,S and R,S,S.  
11. The compound according to claim 10 wherein said configuration is selected from the group consisting of S,S,S and R,S,S.  
12. A process for the preparation of the compound according to claim 5 comprising acylating an amino acid of the formula  
5  
with an acid of the formula  
13  
13. A pharmaceutical composition comprising a compound according to claim 5 in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.  
14. A method of treating hypertension in a mammal comprising administering an effective antihypertensive amount of a compound according to claim 5.  
\* \* \* \* \*

United States Patent

Patent Number: 5,506,244

Date of Patent: Apr. 9, 1996

CYCLOC AMINO ACID DERIVATIVES

Inventor: Cynthia A. Fink, Lebanon, N.J.

Assignee: Ciba-Geigy Corporation, Tarrytown, N.Y.

Appl. No.: 263,859

Filed: Jan. 22, 1994

Related U.S. Application Data

Continuation-in-part of Ser. No. 133,395, Nov. 16, 1993,

Pat. No. 5,452,186.

Int. Cl. A61K 31/44; A61K 31/195;

C07C 235/02; C07D 213/02;

549776; 562/426; 562/427; 562/503; 562/504;

562/505; 562/510; 562/507; 514/438; 514/562;

Field of Search 548/495, 496, 180, 204; 549776, 77; 514/354,

419, 438, 354, 365, 367, 562, 562/426,

427, 503, 504, 505, 506, 507

References Cited

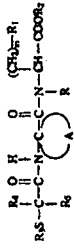
U.S. PATENT DOCUMENTS

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

OTHER PUBLICATIONS

ABSTRACT

Disclosed are the compounds of formula I



wherein R represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl or heterocyclic aryl; lower alkyl or cycloalkyl-lower alkyl; R<sub>1</sub> represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl or heterocyclic aryl; or biaryl; R<sub>2</sub> represents hydrogen or aryl; R<sub>3</sub> represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl or heterocyclic aryl; lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl, biaryl or biaryl-lower alkyl; R<sub>4</sub> represents hydrogen or lower alkyl; or R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> together with the carbon atom to which they are attached represent cycloalkylidene or benzofused cycloalkylidene; A together with the carbon atom to which it is attached represents 3 to 10 membered cycloalkylidene or 3 to 10 membered cycloalkylidene radical which may be substituted by lower alkyl or aryl-lower alkyl or may be fused to a saturated or unsaturated heterocyclic 5-7 membered ring; or A together with the carbon to which it is attached represents 5 or 6 membered oxacyclopentylidene, thiazacyclopentylidene or azacyclopentylidene optionally substituted by lower alkyl or aryl-lower alkyl; or A together with the carbon atom to which it is attached represents 2,2-norbornylidene; m is 0, 1, 2 or 3; and COOR<sub>6</sub> represents carboxyl or carbonyl derivatized in form of a pharmaceutically acceptable salt thereof; pharmacological compositions comprising said compounds; methods for preparation of said compounds; intermediates; and methods of treating disorders in mammals which are responsive to ACE and NEP inhibition by administration of said compounds to mammals in need of such treatment.

26 Claims, No Drawings

5,506,244

CYCLOC AMINO ACID DERIVATIVES

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application is a continuation-in-part of application Ser. No. 08/153,395 filed Nov. 16, 1993, now U.S. Pat. No. 5,452,186.

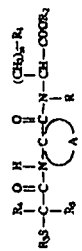
SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to novel cyclic amino acid derivatives described below which are useful as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and as neutral endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) inhibitors. The compounds of the invention are particularly useful for the treatment of conditions which are responsive to ACE and NEP inhibition, particularly cardiovascular disorders, such as hypertension, renal insufficiency (including edema and salt retention), pulmonary edema, congestive heart failure and atherosclerosis. The compounds of the invention are also useful for reducing elevated cholesterol plasma levels in mammals.

By virtue of their inhibition of neutral endopeptidase, the compounds of the invention may also be useful for the treatment of pain, depression, certain psychotic conditions, and cognitive disorders. Other potential indications include the treatment of angina, premenstrual syndrome, Meniere's disease, hyperaldosteronism, hypercalcemia, ascites, glaucoma, asthma and gastrointestinal disorders such as diarrhea, irritable bowel syndrome and gastric hyperacidity.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to cyclic amino acid derivatives of the following formula I:



wherein R represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl or heterocyclic aryl; lower alkyl or cycloalkyl-lower alkyl; R<sub>1</sub> represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl or heterocyclic aryl; or biaryl; R<sub>2</sub> represents hydrogen or aryl; R<sub>3</sub> represents hydrogen, lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl or heterocyclic aryl; lower alkyl, cycloalkyl, cycloalkyl-lower alkyl, biaryl or biaryl-lower alkyl; R<sub>4</sub> represents hydrogen or lower alkyl; or R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> together with the carbon atom to which they are attached represent cycloalkylidene or benzofused cycloalkylidene; A together with the carbon atom to which it is attached represents 3 to 10 membered cycloalkylidene or 5 to 10 membered cycloalkylidene radical which may be substituted by lower alkyl or aryl-lower alkyl or may be fused to a saturated or unsaturated heterocyclic 5-7 membered ring; or A together with the carbon to which it is attached represents 5 or 6 membered oxacyclopentylidene, thiazacyclopentylidene or azacyclopentylidene optionally substituted by lower alkyl or aryl-lower alkyl; or A together with the carbon atom to which it is attached represents 2,2-norbornylidene; m is 0, 1, 2 or 3; and

COOR<sub>6</sub> represents carboxyl or carbonyl derivatized in form of a pharmaceutically acceptable ester, disulfide derivatives derived from said compounds wherein R<sub>6</sub> is hydrogen; and pharmaceutically acceptable salts thereof.

The present invention is also directed to pharmaceutical compositions comprising said compounds; methods for preparation of said compounds; intermediates; and methods of treating disorders in mammals which are responsive to ACE and NEP inhibition by administration of said compounds to mammals in need of such treatment.

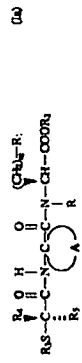
Pharmaceutically acceptable esters are preferably prodrug ester derivatives, such being convertible by solvolysis or under physiological conditions to the free carboxylic acids of formula I.

Encompassed by the instant invention are any prodrug derivatives of compounds of the invention having a free carboxyl, sulfonyl or hydroxy group, said prodrug derivatives being convertible by solvolysis or under physiological conditions to be the free carboxyl, sulfonyl and/or hydroxy compounds. Prodrug derivatives are e.g. the esters of free carboxylic acids and S-acyl and O-acyl derivatives of thiols, alcohols or phenols, wherein acyl has meaning as defined herein.

Pharmaceutically acceptable prodrug esters are preferably e.g. lower alkyl esters, cycloalkyl esters, lower alkyl esters, aryl-lower alkyl esters, α-(lower alkoxymethyl)-lower alkyl esters such as the pinoyloxy-methyl ester, and (4-(lower alkoxycarbonyl)- or di-lower alkylamino carbonyl)-lower alkyl esters.

Pharmaceutically acceptable salts are salts derived from pharmaceutically acceptable bases for any acidic compounds of the invention, e.g. those wherein COOR<sub>6</sub> represents carboxyl. Such are e.g. alkali metal salts (e.g. sodium, potassium salts), alkaline earth metal salts (e.g. magnesium, calcium salts), amine salts (e.g. trimethylamine salts).

Compounds of formula I, depending on the nature of substituents, possess two or more asymmetric carbon atoms. The resulting diastereomers and optical antipodes are encompassed by the instant invention. The preferred configuration is indicated in formula Ia.



wherein asymmetric carbons with the substituents —(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—R<sub>1</sub> and —R<sub>2</sub> have the S-configuration in general, and wherein R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, m and A have meaning as defined above.

Preferred are the compounds of formula I and Ia wherein m is one; R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> represent hydrogen; R<sub>3</sub> represents (monocyclic or bicyclic)-carboxylic aryl or heterocyclic aryl; or biaryl; R<sub>4</sub> represents hydrogen or aryl derived from a carboxylic acid; R<sub>5</sub> represents hydrogen, lower alkyl or cycloalkyl; chain alkylene optionally substituted by lower alkyl, or C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> straight chain alkylene interrupted by 1,2-phenylene or by 1,2-C<sub>6</sub> or C<sub>6</sub>-cycloalkylene, or C<sub>2</sub> or C<sub>3</sub>-straight chain alkylene interrupted by oxygen, sulfur or NR<sub>6</sub>, wherein R<sub>6</sub> is hydrogen, aryl-lower alkyl or lower alkyl; COOR<sub>6</sub> represents carboxyl or carbonyl derivatized in form of a pharmaceutically acceptable ester, disulfide derivatives derived from said compounds wherein R<sub>6</sub> is hydrogen, and pharmaceutically acceptable salts thereof.



The above-cited properties are demonstrable in vitro and in vivo tests, using advantageously mammals, e.g., mice, rats, dogs, monkeys or isolated organs, tissues and preparations thereof. Solid compounds can be applied in vivo in the form of solutions, e.g., preferably aqueous solutions, and in vivo either orally, parenterally, advantageously orally or intravenously, e.g., as a suspension or in aqueous solution. The dosage in vivo may range between about 10<sup>-6</sup> molar and 10<sup>-2</sup> molar concentrations. The dosage in vivo may range depending on the route of administration, between about 0.01 and 50 mg/kg, advantageously between about 0.1 and 25 mg/kg.

In vivo testing is most appropriate for the free carboxylic acids of the invention. The test compound is dissolved in dimethyl sulfoxide, ethanol, or 0.25 M sodium bicarbonate solution, and the solution is diluted with buffer to the desired concentration.

The in vitro inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE) by the compounds of this invention can be demonstrated by a method analogous to that given in Biochem. Pharmacol. 20:163/1971. The buffer for the ACE assay is 300 mM NaCl, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.3). The reaction is initiated by the addition of 100 µl of hippuryl-histidyl-leucine (2 mg/ml) to tubes containing enzyme and drug in a volume of 150 µl and tubes are incubated for 30 minutes at 37° C. The reaction is terminated by the addition of 0.75 ml 0.6 N NaOH. 120 µl of freshly prepared O-phthalaldehyde solution (2 mg/ml in methanol) is added to the tubes, the contents are mixed and allowed to stand at room temperature. After 10 minutes, 100 µl of 0.1 N HCl is added. The tubes are centrifuged and the supernatant optical density is read at 360 nm. The results are plotted against drug concentration to determine the IC<sub>50</sub>, i.e., the drug concentration which gives half the activity of the control sample containing no drug.

Disadvantage of the invention, the compounds of example 2a and of example 2b demonstrate an IC<sub>50</sub> of about 7 nM and about 19 nM, respectively, in the ACE in vitro assay.

Inhibition of angiotensin converting enzyme can be demonstrated in vivo on oral or intravenous administration by measuring inhibition of the angiotensin I induced pressor response in normotensive rats.

The in vivo test for intravenously administered compounds is performed with male, normotensive rats, which are anesthetized with sodium methofan. A femoral artery and femoral vein are cannulated respectively for direct blood pressure measurement on i.v. administration of angiotensin I and i.v. or p.o. administration of a compound of this invention. After the basal blood pressure is stabilized, pressor responses to 3 challenges of 100 ng/kg angiotensin I, i.v., at 15 minute intervals, are obtained. Such pressor responses are usually again obtained at 15, 30, 60 and 90 minutes, and then every hour up to 6 hours after i.v. or p.o. administration of the compound to be tested, and compared with the initial responses. Any observed decrease of said pressor response is an indication of Angiotensin I converting enzyme inhibition.

Illustrative of the invention, the compound of example 1 (b) inhibits the Angiotensin I induced pressor response for six hours at a dose of 10 mg/kg p.o.

The in vitro inhibition of neutral endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) can be determined as follows:

Neutral endopeptidase 3.4.24.11 activity is determined by the hydrolysis of the substrate glutaryl-Ala-Ala-Phe-2-naphthylamide (GAP) using a modified procedure of Olowu and Wida (1981). The incubation mixture (total volume 125 µl) contains 4.2 µg of protein (rat kidney cortex membranes

prepared by method of Masda et al. (1983). 50 mM Tris buffer, pH 7.4 at 25° C., 500 µM substrate (final concentration), and leucine aminopeptidase M (2.5 u). The mixture is incubated for 10 minutes at 25° C. and 100 µl of fast green (250 µg fast green/ml of 10% Tween 20 in 1 M sodium acetate, pH 4.2) is added. Enzyme activity is measured spectrophotometrically at 540 nm. One unit of NEP (24.11) activity is defined as 1 nmol of 2-naphthylamine released per minute at 25° C at pH 7.4. IC<sub>50</sub> values are determined, i.e. the concentration of test compound required for 50% inhibition of the release of 2-naphthylamine.

Neutral endopeptidase activity can also be determined using ANP as a substrate. Atrial natriuretic factor degrading activity is determined by measuring the disappearance of rat-ANP (r-ANP) using a 3 minute reverse phase-HPLC separation. An aliquot of the enzyme in 50 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, is preincubated at 37° C. for 2 minutes and the reaction is initiated by the addition of 4 nmol of r-ANP in a total volume of 90 µl. The reaction is terminated after 4 minutes with the addition of 30 µl of 0.27% trifluoroacetic acid (TFA). One unit of activity is defined as the hydrolysis of 1 nmol of r-ANP per minute at 37° C. at pH 7.4. IC<sub>50</sub> values are determined, i.e. the concentration of test compound required for 50% inhibition of the hydrolysis of ANP.

Illustrative of the invention, the compounds of example 2a and of example 2b demonstrate an IC<sub>50</sub> of about 2 nM and about 2.2 nM, respectively, in the GAP in vitro assay.

The effect of the compounds of the invention on rat plasma ANF concentration can be determined as follows:

Male Sprague-Dawley rats (275-300 g) are anesthetized with ketamine (150 mg/kg/aseptamine (10%) and intubated with catheters in the femoral artery and vein to obtain blood samples and infuse ANF, respectively. The rats are tethered with a respiration system and are allowed to recover for 24 hours before being studied in the conscious, unrestrained state.

In the assay, plasma ANF levels are determined in the presence and absence of NEP-inhibition. On the day of study, all rats are infused continuously with ANF at 450 ng/kg/min. i.v. for the entire 5 hours of the experiment. Sixty minutes after beginning the infusion, blood samples for baseline ANF measurements are obtained (time 0) and the rats are then randomly divided into groups treated with the test compound or vehicle. Additional blood samples are taken at 30, 60, 120, 180, and 240 minutes after administration of the test compound.

Plasma ANF concentrations are determined by a specific radioimmunoassay. The plasma is diluted (X 12.5, X 25 and X 50) in buffer containing: 50 mM Tris (pH 6.8), 154 mM NaCl, 0.3% bovine serum albumin, 0.01% BSA. One hundred microliters of standards (ANF (99-126)) or samples are added to 100 µl of rabbit anti-ANF serum and incubated at 4° C. for 16 hours. The bound complex is precipitated in 4° C. for 16 hours. The bound complex is incubated at 4° C. for an additional 24 hours. Goat anti-rabbit IgG serum coupled to paramagnetic particles is added to the reaction mixture and bound [<sup>125</sup>I]-ANF is pelleted by exposing the mixture to an irradiating magnetic rack. The supernatant is decanted and the pellets counted in a gamma counter. All determinations are performed in duplicate.

Plasma ANF levels are expressed as a percent of those measured in vehicle-treated animals which received ANF alone (450 ng/kg/min i.v.).

The antihypertensive activity can be determined e.g. in the spontaneously hypertensive rat and the DOCA-salt hypertensive rat, e.g. according to Trapnell et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 14, 419-424 (1982).

The antihypertensive effect can be determined in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats as follows:

DOCA-salt hypertensive rats (280-380 g) are prepared by the standard method. Rats underwent a unilateral nephrectomy and one week later are implanted with silastic pellets containing 100 mg/kg of DOCA. The rats are maintained on 1% NaCl/0.2% KCl drinking water for three to five weeks until sustained hypertension is established. The antihypertensive activity is evaluated at this time.

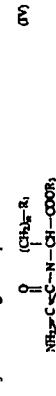
Two days before an experiment, the rats are anesthetized with methoxyflurane and instrumented with catheters in the femoral artery to measure arterial blood pressure. Forty-eight hours later, baseline arterial pressure and heart rate are recorded during a 1 hour period. The test compound or vehicle is then administered and the same cardiovascular parameters are monitored for an additional 5 hours.

The antihypertensive effect can also be determined in spontaneously hypertensive rats by indirect measurement of systolic pressure. Conscious rats are placed individually in restraint cages within a gently warmed chamber. A rubber pulse sensor is placed distal to an inflatable occlusive cuff on each rat's tail. The cuff is periodically inflated to occlude the tail artery, and systolic pressure is recorded as the point where the first discernible pulse emerges along the decaying calibrated pressure curve. After obtaining control values of blood pressure and heart rate, test compounds are administered orally once daily for 4 consecutive days. Additional blood pressure measurements are usually made at 2.0, 4.0 and 23.5 hours after each daily dosing, and responses are compared to those of rats dosed with the treatment vehicle.

The diuretic (salutic) activity can be determined in standard diuretic screens, e.g. as described in "New Antihypertensive Drugs", Spectrum Publications, 1976, pages 307-321, or by measuring the potentiation of atrial natriuretic factor-induced natriuresis and diuresis in the rat. The potentiation of the natriuretic effect of ANP can be determined as follows:

Male Sprague-Dawley rats (280-360 g) are anesthetized with Inactin (100 mg/kg i.p.) and instrumented with catheters in the femoral artery, femoral vein and urinary bladder to measure arterial pressure, administer ANP and collect urine, respectively. A continuous infusion of normal saline (33 µl/min) is maintained throughout the experiment to promote diuresis and sodium excretion. The experimental protocol consists of an initial 15 minute collection period (designated as pre-control) followed by three additional collection periods. Immediately after completion of the pre-control period, test compound or vehicle is administered; nothing is done for the next 45 minutes. Then, blood pressure and renal measurements are obtained during a second collection period (designated control; 15 minutes). At the conclusion of this period, ANP is administered (1 µg/kg i.v. bolus) to all animals and arterial pressure and renal parameters are determined during two consecutive 15 minutes collection periods. Mean arterial pressure, urine flow and urinary sodium excretion are determined for all collection periods. Blood pressure is measured with a Gould p50 pressure transducer, urine flow is determined gravimetrically, sodium concentration is measured by flame photometry, and urinary sodium excretion is calculated as the product of urine flow and urine sodium concentration.

The compounds of the invention, e.g. can be prepared (a) by condensing a compound of formula IV



wherein the symbols m, A, R and R<sub>1</sub> have the meaning as defined above and COOR<sub>2</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>3</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>4</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>5</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>6</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>7</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>8</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>9</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>10</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>11</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>12</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>13</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>14</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>15</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>16</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>17</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>18</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>19</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>20</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>21</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>22</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>23</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>24</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>25</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>26</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>27</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>28</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>29</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>30</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>31</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>32</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>33</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>34</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>35</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>36</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>37</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>38</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>39</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>40</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>41</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>42</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>43</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>44</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>45</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>46</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>47</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>48</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>49</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>50</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>51</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>52</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>53</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>54</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>55</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>56</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>57</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>58</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>59</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>60</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>61</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>62</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>63</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>64</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>65</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>66</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>67</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>68</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>69</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>70</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>71</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>72</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>73</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>74</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>75</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>76</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>77</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>78</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>79</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>80</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>81</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>82</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>83</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>84</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>85</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>86</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>87</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>88</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>89</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>90</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>91</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>92</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>93</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>94</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>95</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>96</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>97</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>98</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>99</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>100</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>101</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>102</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>103</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>104</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>105</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>106</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>107</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>108</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>109</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>110</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>111</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>112</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>113</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>114</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>115</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>116</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>117</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>118</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>119</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>120</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>121</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>122</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>123</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>124</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>125</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>126</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>127</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>128</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>129</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>130</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>131</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>132</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>133</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>134</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>135</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>136</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>137</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>138</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>139</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>140</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>141</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>142</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>143</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>144</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>145</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>146</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>147</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>148</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>149</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>150</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>151</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>152</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>153</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>154</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>155</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>156</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>157</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>158</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>159</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>160</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>161</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>162</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>163</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>164</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>165</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>166</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>167</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>168</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>169</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>170</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>171</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>172</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>173</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>174</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>175</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>176</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>177</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>178</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>179</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>180</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>181</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>182</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>183</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>184</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>185</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>186</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>187</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>188</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>189</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>190</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>191</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>192</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>193</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>194</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>195</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>196</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>197</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>198</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>199</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>200</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>201</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>202</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>203</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>204</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>205</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>206</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>207</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>208</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>209</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>210</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>211</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>212</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>213</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>214</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>215</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>216</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>217</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>218</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>219</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>220</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>221</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>222</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>223</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>224</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>225</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>226</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>227</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>228</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>229</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>230</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>231</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>232</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>233</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>234</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>235</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>236</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>237</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>238</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>239</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>240</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>241</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>242</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>243</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>244</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>245</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>246</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>247</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>248</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>249</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>250</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>251</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>252</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>253</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>254</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>255</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>256</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>257</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>258</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>259</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>260</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>261</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>262</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>263</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>264</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>265</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>266</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>267</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>268</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>269</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>270</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>271</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>272</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>273</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>274</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>275</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>276</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>277</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>278</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>279</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>280</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>281</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>282</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>283</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>284</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>285</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>286</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>287</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>288</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>289</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>290</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>291</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>292</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>293</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>294</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>295</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>296</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>297</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>298</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>299</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>300</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>301</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>302</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>303</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>304</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>305</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>306</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>307</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>308</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>309</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>310</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>311</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>312</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>313</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>314</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>315</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>316</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>317</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>318</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>319</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>320</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>321</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>322</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>323</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>324</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>325</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>326</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>327</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>328</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>329</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>330</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>331</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>332</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>333</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>334</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>335</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>336</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>337</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>338</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>339</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>340</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>341</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>342</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>343</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>344</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>345</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>346</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>347</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>348</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>349</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>350</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>351</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>352</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>353</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>354</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>355</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>356</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>357</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>358</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>359</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>360</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>361</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>362</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>363</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>364</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>365</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>366</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>367</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>368</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>369</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>370</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>371</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>372</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>373</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>374</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>375</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>376</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>377</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>378</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>379</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>380</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>381</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>382</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>383</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>384</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>385</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>386</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>387</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>388</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>389</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>390</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>391</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>392</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>393</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>394</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>395</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>396</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>397</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>398</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>399</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>400</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>401</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>402</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>403</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>404</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>405</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>406</sub> represents esterified carboxyl, defined above and COOR<sub>407</sub> represents esterified carboxyl

described herein, functional group present, such as thiol, carboxyl, amino and hydroxy groups, are optionally protected by conventional protecting groups that are common in preparative organic chemistry. Protected thiol, carboxyl, amino and hydroxy groups are those that can be converted under mild conditions into free thiol, carboxyl, amino and hydroxy groups without other undesired side reactions taking place.

The purpose of introducing protecting groups is to protect the functional groups from undesired reactions with reaction components and under the conditions used for carrying out a desired chemical transformation. The need and choice of protecting groups for a particular reaction is known to those skilled in the art and depends on the nature of the functional group to be protected (thiol, carboxyl, amino group, etc.), the structure and stability of the molecule of which the substituent is a part, and the reaction conditions.

Well-known protecting groups that meet these conditions and their introduction and removal are described, for example, in I. F. W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London, N.Y. 1973; T. W. Greene and P. G. M. Woots, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. 1991, and also in "The Peptides", Vol. 1, Schneider and Luibke, Academic Press, London, N.Y., 1965.

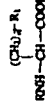
The preparation of compounds of the invention according to process (a) involving the condensation of an amine of formula IV with the acid of formula V or a functional reactive derivative thereof, is carried out by methodology well-known for peptide synthesis.

The condensation according to process (a) of an amine ester of formula IV with a free carboxylic acid of formula V is carried out advantageously in the presence of a condensing agent such as diisopropylcarbodiimide or N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide and hydroxybenzotriazole, 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, 1-ylonylsuccinylhydrazide or benzotriazole, 1-ylonylsuccinylhydrazide, and triethylamine or N-methylmorpholine, in an inert polar solvent such as dimethylformamide or methylene chloride, preferably at room temperature.

The condensation of an amine ester of formula IV with a reactive functional derivative of an acid of formula V in the form of an acid halide, advantageously an acid chloride, or mixed anhydride, is carried out in an inert solvent such as toluene or methylene chloride, advantageously in the presence of a base, e.g. an inorganic base such as potassium carbonate or an organic base such as triethylamine, N-methylmorpholine or pyridine, preferably at room temperature. Reactive functional derivatives of carboxylic acids of formula V are preferably acid halides (e.g. the acid chloride) and mixed anhydrides, such as the phosnyl or isobutyl-acylcarboxyl anhydride, or activated esters such as benzotriazole, 7-substituted or hexafluorophenyl ester.

The starting material of formula IV can be prepared according to methods described herein and illustrated in the examples.

The preparation of a starting material of formula IV involves the acylation of an ester of the amino acid of formula X



wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> have meanings as defined hereinabove and COOH<sub>2</sub> represents esterified carboxyl (e.g. wherein R<sub>2</sub> is lower alkyl or benzyl) with an appropriately N-protected cyclic polar solvent (or a reactive functional derivative) of



wherein A has meanings as defined hereinabove and R<sub>2</sub> is a labile amino protecting group, e.g. t-butyloxycarbonyl, to obtain the corresponding N-protected compound of formula IV.

The condensation of a compound of formula X with a compound of formula XI is carried out by methodology well known in peptide synthesis, e.g. as described above for the condensation of a compound of formula IV with a compound of formula V. The N-protecting group is removed according to methods well-known in the art, e.g. the t-butyloxycarbonyl is removed with anhydrous acid such as trifluoroacetic acid.

The starting amino acids and esters of compounds of formula X and XI are either known in the art or if new can be prepared according to methods well-known in the art, e.g. from the corresponding aldehyde or ketone. The amino acids of formula X are preferably obtained as the S<sub>N</sub> enantiomers.

The starting materials of formula V are known or if new may be prepared according to conventional methods. The starting materials are prepared e.g. from the corresponding racemic or optically active α-amino acids, by conversion thereof to the α-bromo derivative followed by displacement thereof with the appropriate thio acids or optionally substituted benzylthiol, under basic conditions, for example as illustrated in European Patent application No. 524,553 published Jan. 27, 1993. S-Debenzylation of the resulting final products is carried out by reductive cleavage, e.g. with Raney nickel in ethanol. S-Debenzylation is carried out by e.g. base catalyzed hydrolysis with dilute aqueous sodium hydroxide, or sodium hydroxide in methanol. Cyclic starting materials of formula V can be prepared by treatment of a cyclic carboxylic acid (e.g. cyclopentamethanecarboxylic acid) with sulfur in the presence of a strong base such as lithium diethylamide.

The preparation of the compounds of the invention according to process (b) involving the condensation of an acid of formula VI with an amino acid ester of formula VII is carried out in a similar fashion to process (a). Similarly the starting materials of formula VI are prepared by condensation of an acid of formula V with an ester corresponding to cyclic amino acids of formula XI (wherein R<sub>2</sub> is now hydrogen) under conditions similar to those described above, followed by removal of the carboxyl protecting group.

The preparation of the compounds of the invention according to process (c) involving the displacement of a leaving group X in a compound of formula VIII with a sulfhydryl derivative R<sub>2</sub>-SH is carried out according to methods well-known in the art.

A reactive esterified hydroxyl group, represented by X, is a hydroxyl group esterified by a strong inorganic or organic acid. Corresponding X groups are in particular halo, for example chloro, bromo or iodo, also sulfonyloxy groups, such as lower alkyl- or arylsulfonyloxy groups, for example (methanesulfonyl-, ethanesulfonyl-, benzoylsulfonyl-, isobutyrylsulfonyl-, or trifluoromethylsulfonyloxy) groups.

The displacement is carried out in an inert solvent, such as dimethylformamide or methylene chloride, in the presence of a base such as potassium carbonate, triethylamine, diisopropylethylamine, N-methylmorpholine, and the like at room or elevated temperature.

Similarly, the starting materials of formula VIII can be prepared by reacting the dipeptide derivative of formula IV with an acid of the formula



wherein R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> have meanings as defined above, under conditions described for process (a). Certain compounds of the invention and intermediates can be converted to each other according to general reactions well known in the art.

The free macrocyclic can be converted to the S-acyl derivatives by reaction with a reactive derivative of a carboxylic acid (corresponding to R<sub>3</sub> being acyl in formula I), such as an acid anhydride or acid chloride, preferably in the presence of cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) in an inert solvent such as acetonitrile or methylene chloride.

Free alcohols and phenols can be converted to the corresponding acyl derivatives e.g. by reaction with a corresponding acid chloride in the presence of a base, such as triethylamine.

The free macrocyclic, wherein R<sub>3</sub> represents hydrogen, may be oxidized to the corresponding disulfides, e.g. by an oxidation or with the use of mild oxidizing agents such as iodine in alcoholic solution. Conversely, disulfides may be reduced to the corresponding macrocyclic, e.g. with reducing agents such as sodium borohydride, zinc and acetic acid or tributylphosphine.

Carboxylic acid esters may be prepared from a carboxylic acid by condensation with e.g. the halide corresponding to R<sub>3</sub>-OH, in the presence of a base, or with an excess of the alcohol, in the presence of an acid catalyst, according to methods well-known in the art.

Carboxylic acid esters and S-acyl derivatives may be hydrolyzed, e.g. with aqueous alkali such as alkali metal carbonates or hydroxides.

In case mixtures of stereoisomers (e.g. diastereomers) are obtained, these can be separated by known procedures such as fractional crystallization and chromatography (e.g. thin layer, column, flash chromatography). Racemic free acids can be resolved into the optical antipodes by fractional crystallization of 4- or 1-(α-methylbenzyl)amine, cinchonidine, cinchonine, quinine, quaidine, dehydroxyquinine, brucine or arcyline salts and the like. Racemic products, if not diastereomers, can first be converted to diastereomers with optically active reagents (such as optically active alcohols to form esters) which can then be separated as described above, and e.g. hydrolyzed to the individual enantiomers. Racemic products can also be resolved by chiral chromatography, e.g. high pressure liquid chromatography using a chiral adsorbent, also by enzymatic resolution, e.g. of esters with alkalase.

The above-mentioned reactions are carried out according to standard methods, in the presence or absence of diluents preferably such as are inert to the reagents and are solvents thereof, of catalysts, alkaline or acidic atmosphere, at low temperatures, room temperature or elevated temperatures, preferably near the boiling point of the solvents used, as atmospheric or superatmospheric pressure.

The invention further includes any variant of said process, in which an intermediate product obtainable at any stage of the process is used as a starting material and any remaining steps are carried out, or the process is discontinued at any stage thereof, or in which the starting materials are formed under the reaction conditions, or in which the reaction components are used in the form of their salts or

optically pure antipodes. Mainly these starting materials should be used in acid reactions, that lead to the formation of those compounds indicated above as being preferred.

The present invention additionally relates to the use in mammals of the compounds of the invention and their pharmaceutically acceptable, non-toxic acid addition salts, or pharmaceutically acceptable salts thereof, as medicaments, for inhibiting angiotensin converting enzyme (ACE) and neutral endopeptidase (NEP), and e.g. for the treatment of cardiovascular disorders such as hypertension, edema, salt retention and congestive heart failure.

The present invention also relates to the use of the compounds of the invention for the preparation of pharmaceutical compositions especially pharmaceutical compositions having angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibiting activity, and e.g. antihypertensive activity.

The pharmaceutical compositions according to the invention are those suitable for oral, such as oral or rectal, transdermal, and parenteral administration to mammals, including man, for the treatment of cardiovascular disorders, such as hypertension, comprising an effective amount of a pharmaceutically acceptable compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, alone or in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers.

The pharmacologically active compounds of the invention are useful in the manufacture of pharmaceutical compositions comprising an effective amount thereof in conjunction or admixture with excipients or carriers suitable for either oral or parenteral application. Preferred are tablets and gelatin capsules comprising the active ingredient together with a diluent, e.g. lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycerine; b) lubricants, e.g. silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salts and/or polyethylene glycol; for tablets also c) binders, e.g. magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, tragacanth, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and/or polyvinylpyrrolidone; if desired, d) disintegrants, e.g. starches, agars, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures; and/or e) colorants, flavorants and sweeteners. Injectable compositions are preferably aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions. Said compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, the compositions may also contain other therapeutically valuable substances. Said compositions are prepared according to conventional mixing, granulating or coating methods, respectively, and contain about 0.1 to 75%, preferably about 1 to 50%, of the active ingredient.

Suitable formulations for transdermal application include an effective amount of a compound of the invention with a carrier. Advantageous carriers include absorbable pharmacologically acceptable solvents to assist passage through the skin of the host. Characteristically, transdermal devices are in the form of a bandage comprising a backing member, a reservoir containing the compound, optionally with carriers, optionally a rate controlling barrier to deliver the compound to the skin of the host at a controlled and predetermined rate over a prolonged period of time, and means to secure the device to the skin.

A unit dosage for a mammal of about 50 to 70 kg may contain between about 1 and 50 mg of the active ingredient. The dosage of active compound is dependent on the species

of warm-blooded animal (mammal), the body weight, age and individual condition, and on the form of administration. The following examples are intended to illustrate the invention and are not to be construed as being limitations thereon. Temperatures are given in degrees Centigrade. If not mentioned otherwise, all evaporations are performed under reduced pressure, preferably between about 15 and 100 mm Hg. Optical rotations are measured at room temperature at 399 nm (D line of sodium) or other wavelengths as specified in the examples.

The prefixes R and S are used to indicate the absolute configuration at each asymmetric center. L-Amino acids as used herein correspond to the S-configuration.

## EXAMPLE 1

(a) To a solution of [(1-aminocyclohexyl)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester hydrochloride (1.56 g, 3.97 mmol) in dichloromethane (50 mL) is added triethylamine (0.55 mL, 3.97 mmol). The mixture is stirred for 5 minutes and then (S)-2-acetylthio-3-methylbutanoic acid (0.70 g, 3.97 mmol), 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (0.82 g, 3.97 mmol) and 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (0.54 g, 3.97 mmol) are added. The mixture is stirred for 16 hours and then the solid precipitate is filtered off. The organic phase is washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (30 mL), brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure to give a white foam. The foam is purified by flash chromatography on silica gel, eluting with hexane-ethyl acetate (1:1). The pure fractions are concentrated and the resulting foam is crystallized from ethyl acetate-hexane to afford N-[(1-aminocyclohexyl)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester as a white solid, m.p. 157°-158° C., the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl.

The starting material is prepared as follows:

To a stirred solution of L-tyrosine methyl ester hydrochloride (5.84 g, 25.3 mmol) and N-[(1,1-dimethylthio)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester hydrochloride (5.84 g, 25.3 mmol) in dioxane (50 mL) and 1N NaOH (14.34 g, 63.8 mmol) is added di-tert-butyl dicarbonate (14.34 g, 63.8 mmol). The mixture is stirred for 3 hours and then concentrated under reduced pressure. The residue is dissolved in water (50 mL) and washed with ethyl acetate (2x15 mL). The aqueous phase is acidified to pH 2 with 1N HCl and then extracted with ethyl acetate (3x50 mL). The combined organic phases are washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and the solvent is removed to yield 1-N-[(1,1-dimethylthio)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester as a white foam.

To a stirred solution of L-tyrosine methyl ester hydrochloride (5.84 g, 25.3 mmol) and N-[(1,1-dimethylthio)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester hydrochloride (5.84 g, 25.3 mmol) in dioxane (50 mL) and 1N NaOH (14.34 g, 63.8 mmol) is added di-tert-butyl dicarbonate (14.34 g, 63.8 mmol). The mixture is stirred for 3 hours and then concentrated under reduced pressure. The residue is dissolved in water (50 mL) and washed with ethyl acetate (2x15 mL). The aqueous phase is acidified to pH 2 with 1N HCl and then extracted with ethyl acetate (3x50 mL). The combined organic phases are washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and the solvent is removed to yield 1-N-[(1,1-dimethylthio)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester as a white foam.

To a solution of N-[(1-[(1,1-dimethylthio)carbamoyl]-L-cyclohexyl)carbamoyl]-L-tyrosine methyl ester (3.50 g, 8.6 mmol) in dichloromethane (60 mL) and ethyl acetate (10 mL) is bubbled dry HCl gas for 15 minutes. The solvent is then removed under reduced pressure to give a foam. [1-aminocyclohexyl]carbamoyl-L-tyrosine methyl ester hydrochloride.

(b) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 148°-149° C.

(c) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is benzyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 66°-67° C.

(d) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-acetoxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 54°-55° C.

(e) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-(phenylacetyl)oxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 121°-122° C.

(f) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is benzyl; m.p. 137°-138° C.

(g) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-fluorophenyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 123°-124° C.

(h) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 2-methyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 123°-124° C.

(i) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is hydrogen; m.p. 91°-92° C. (dec.)

(j) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is isobutyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 110°-112° C.

(k) Similarly prepared is the compound of formula IIIa wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is 2,2-dimethylpropanoyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 132°-133° C.

(l) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is 2,2-dimethylpropanoyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 150°-151° C.

(m) Similarly prepared is the compound of formula II wherein R<sub>1</sub> is 5, R<sub>2</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>3</sub> is methyl, R<sub>4</sub> is acetyl and R<sub>5</sub> is isopropyl; m.p. 172°-173° C.

(n) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 104°-105° C.

(o) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 119°-120° C.

(p) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-biphenyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 128°-129° C.

(q) Similarly prepared is the compound of formula IIIb wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl and Y is O; m.p. 74°-77° C.

(r) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 119°-120° C.

(s) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is isopropyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 135°-136° C.

(t) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is isobutyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 148°-149° C.

(u) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is isopropyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 94°-95° C.

(v) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is n-propyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 107°-108° C.

(w) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 111°-112° C.

(x) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 65°-66° C.

(y) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is benzyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 101°-103° C.

(z) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-pyridyl, R<sub>2</sub> is methyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 122°-124° C.

(aa) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 5-hydroxy-3-isobutyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 189°-190° C.

(ab) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 114°-115° C.

(ac) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3,4-dihydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 79° C. (dec.)

(ad) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 114.5°-116° C.

(ae) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-thienyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 108.8°-109.6° C.

(af) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is allyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 119°-120° C.

(ag) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is isobutyl, R<sub>3</sub> is n-butyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 108° C.

(ah) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 103°-104° C.

(ai) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is cyclopentyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 138°-139° C.

(aj) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is benzyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 151°-152° C.

(ak) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is propionyl, R<sub>4</sub> is isopropyl.

(al) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is benzyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 82.3°-83.1° C.

(am) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is benzyl, R<sub>2</sub> is benzyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 145.7°-146.3° C.

(an) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is 3-pyridylmethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 94°-96° C.

(ao) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is 3-pyridylmethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 107°-109° C.

(ap) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is benzyl, R<sub>2</sub> is 3-pyridylmethyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 128°-129° C.

(aq) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is benzyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 110°-111° C.; and

(r) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is n-butyl, R<sub>3</sub> is acetyl, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 105°-106° C.

## EXAMPLE 2

(a) To a stirred degassed solution of N-[(1-(2S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)amino]-L-tyrosine methyl ester (0.55 g, 1.19 mmol) in methanol (30 mL) under nitrogen at room temperature is added degassed 1N NaOH (4.74 mL, 4.74 mmol). The solution is stirred for 6 hours and then the concentrated in vacuo. Water (25 mL) is added to the residue and the aqueous layer is washed with ethyl acetate (3x10 mL). The organic phase is acidified to pH 1 with 1N HCl and extracted with ethyl acetate (3x50 mL). The combined organic phases are washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and then concentrated under reduced pressure to afford a white foam (0.38 g). The product is crystallized from ethyl acetate (5 mL) and dried under vacuum at 40° C. for 16 hours to yield N-[(1-(2S)-mercapto-3-methyl-1-oxobutyl)amino]-L-tyrosine methyl ester (0.107 g, 20% yield; m.p. 209°-210° C.; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -51.9° (methanol, c 1.07), the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl.

(b) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen, and R<sub>4</sub> is benzyl; m.p. 187°-188° C.

(c) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 118°-119° C.

(d) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-thiophenyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 165°-169° C.

(e) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 2-thienyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 175°-176° C. (dec.)

(f) Similarly prepared is the compound of formula II wherein R<sub>1</sub> is 5, R<sub>2</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>3</sub> is hydrogen, R<sub>4</sub> is hydrogen and R<sub>5</sub> is isopropyl; m.p. 112°-114° C.

(g) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> is isobutyl, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 182°-184° C.

(h) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 91°-92° C.

(i) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 171°-172° C.

(j) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 3-isobutyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen, R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 145°-146° C.

(k) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-biphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; m.p. 180°-181° C.

(l) Similarly prepared is the compound of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen, R<sub>4</sub> is O and R<sub>5</sub> is isopropyl; m.p. 221° C. (dec.)

- (m) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is benzyl,  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 203°-204° C.
- (n) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 2-pyridyl,  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 175°-176° C.
- (o) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 3-pyridyl,  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 218°-219° C.
- (p) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 5-hydroxy-3-indolyl,  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 105° dec.

EXAMPLE 3

- (a) To a solution of N-[(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine ethyl ester (0.11 g, 0.23 mmole) in 5 ml. methylene chloride is added triethylamine (0.032 ml, 0.23 mmole) followed by 2-thiophenecarbonyl chloride (0.034 g, 0.23 mmole). The reaction mixture is stirred at room temperature for 1 hour. Water is added, the methylene chloride layer is separated, washed with water, dried over  $MgSO_4$ , and evaporated to dryness. The resulting solid is recrystallized from ether to yield the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(2-thienylcarbonyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 125°-126° C.
- (b) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(2-(4-ethoxyphenyl)-acetyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 71°-72° C.
- (c) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(2-methylpropionyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 118°-119° C.
- (d) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(2-(acetylthio)-acetyloxy)-phenyl,  $R_2$  is methyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is hydrogen.
- (e) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(pyridylcarbonyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 85°-86° C.
- (f) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(2-methoxyacetyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 80°-81° C.
- (g) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(ethoxycarbonyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 94°-95° C.
- (h) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(propionyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 102°-103° C.
- (i) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-(nitroxyloxy)-phenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is acetyl and  $R_4$  is isopropyl; m.p. 67°-68° C.

EXAMPLE 4

- To a stirred solution of 1-mercapto-1-cyclopentane-carboxylic acid (1.74 g, 4.54 mmole) in dichloromethane (50 ml) and triethylamine (0.63 ml) is added (1-aminobutyl)-1-cyclopentylcarbamate (0.63 mmole) and triethylamine (0.63 ml, 4.55 mmole). The mixture is stirred for 14 hours and then the solid precipitate is removed by filtration. The organic phase is washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (10 ml), brine (10 ml), dried over magnesium sulfate and the solvent is removed to give a clear

oil. The oil is purified by flash chromatography ( $SiO_2$ , hexane/ethyl acetate, 6/4) to give a clear foam. The foam is crystallized from ethyl ether to yield N-[(1-(1-(2-mercapto-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine butyl ester, m.p. 106°-107° C.

EXAMPLE 5

- To a stirred solution of N-[(1-(1-(2-mercapto-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine butyl ester (0.47 g, 0.99 mmole) in degassed methanol is added 1N sodium hydroxide (3.00 mL, 3.00 mmole). The mixture is stirred for 17 hours. The solvent is removed in vacuo and water (30 mL) is added to the residue. The aqueous phase is washed with ethyl acetate (10 mL) and then acidified to pH 1 with 1N hydrochloric acid. The aqueous phase is extracted with ethyl acetate (30-50 mL), washed with brine and dried over magnesium sulfate. The solvent is removed in vacuo to afford a foam which is crystallized from hexane/ethyl acetate to give N-[(1-(1-(2-mercapto-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine, m.p. 90° C.

EXAMPLE 6

- To a degassed solution of N-[(1-(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester (2.4 g, 4.74 mmole) in methanol at 0° C. is added dropwise 1N sodium hydroxide (4.74 mL, 4.74 mmole). The mixture is stirred for 30 minutes, neutralized to pH 3 with 1N hydrochloric acid and concentrated to dryness. The residue is dissolved in a mixture of water and ethyl acetate. The organic phase is separated, washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness to yield N-[(1-(1-(2-(S)-mercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester, m.p. 182°-183° C.
- Similarly prepared are e.g. the corresponding ethyl, pentyl and benzyl esters.

EXAMPLE 7

- (a) A mixture of N-[(1-(1-(2-(S)-mercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine ethyl ester (0.32 g, 0.73 mmole), cyclopentanecarboxylic acid (0.083 g, 0.73 mmole), diethyl ether/tetrahydrofuran (0.15 g, 0.73 mmole), and triethylamine (0.10 mL, 0.73 mmole) in methylene chloride (30 mL) is stirred overnight at room temperature. The resulting mixture is filtered, washed with sodium bicarbonate solution, then with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The residue is purified by flash chromatography on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate. The pure fractions are concentrated and the residue is crystallized from diethyl ether to yield N-[(1-(1-(2-(S)-cyclopentylcarbonyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine ethyl ester, m.p. 130°-131° C., the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is cyclopentylcarbonyl, and  $R_4$  is isopropyl.
- (b) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is cyclopentylcarbonyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 140° C.
- (c) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is cyclopentylcarbonyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 102°-103° C.

- (d) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is propionyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 102° C.
- (e) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 3-indolyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is morpholinoacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 165°-168° C.
- (f) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-pentyl,  $R_3$  is 2-methylpropionyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 116° C.
- (g) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 3-indolyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is 2-methoxyacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 93°-95° C.
- (h) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-methoxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is 2-methoxyacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 95°-100° C.
- (i) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-methoxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is propionyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 99°-107° C.
- (j) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is 2-methylpropionyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 125° C.
- (k) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is morpholinoacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 143°-144° C.
- (l) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is propionyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 130°-131° C.
- (m) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is n-butyl,  $R_3$  is methylacrylate,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 110°-111° C.
- (n) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is morpholinoacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 147°-148° C.
- (o) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is methoxyacetyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 129°-130° C.
- (p) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is dimethylaminomethyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 136°-137° C. and
- (q) Similarly prepared is the compound of formula III wherein  $R_1$  is 4-hydroxyphenyl,  $R_2$  is ethyl,  $R_3$  is 2-pyridylcarbonyl,  $R_4$  is isopropyl; m.p. 154°-155° C.

EXAMPLE 8

- Similarly prepared to methods in the previous examples are:
- (a) N-[(1-(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine ethyl ester, m.p. 145°-146° C.
- (b) N-[(1-(1-(2-(S)-mercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine, m.p. 186°-187° C.
- (c) N-[(1-(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine methyl ester, m.p. 74°-77° C.
- (d) N-[(1-(1-(2-(S)-mercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine, m.p. 105° C. dec.
- (e) N-[(1-(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester, m.p. 134°-135° C.
- (f) N-[(1-(1-(2-(R)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester, m.p. 102°-103° C.

- (g) N-[(1-(1-(2-(R)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester, m.p. 139°-140° C. and
- (h) N-[(1-(1-(2-(R)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine ethyl ester, m.p. 97°-98° C.

EXAMPLE 9

- (a) N-[(1-(1-(2-(S)-bromo-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-L-tyrosine n-butyl ester (0.141 g, 0.265 mmole) is dissolved in tetrahydrofuran (2.0 mL). To this is added at room temperature triethylamine (38.0 mg, 0.480 mmole), followed by anhydrous powdered potassium carbonate (325 mesh, 40.0 mg, 0.260 mmole) under an atmosphere of nitrogen. After 2 hours at ambient temperature the mixture is filtered and the filtrate is diluted with ethyl acetate and washed with saturated sodium bicarbonate solution. 1 N hydrochloric acid, 50% brine and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and filtered. The filtrate is evaporated in vacuo (40 Torr) to obtain crude product. This can be crystallized from ethanol/water to obtain white needles of N-[(1-(1-(2-(S)-acetylmercapto-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine n-butyl ester, the compound of example 1 (b).
- The starting material is prepared as follows:
- N-[(1-(1-(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl)amino)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine n-butyl ester (1.96 g, 4.24 mmole) is suspended in ethyl acetate (20 mL), into this mixture is introduced anhydrous hydrogen chloride until saturation occurs (~3 minutes). After standing at room temperature for 1.5 hours the reaction is complete and the solvent is stripped in vacuo to obtain crude N-[(1-(1-aminobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine n-butyl ester (methylchloride) as a gummy solid. This crude solid is used in the next step as is.

The diisopropylamine salt of (R)-2-bromo-3-methylbutyric acid (230 mg, 0.635 mmole) is suspended in tetrahydrofuran (5.0 mL) and the mixture is cooled to -5° C. To this is added chlorodimethoxyacetate (112 mg, 0.625 mmole) as a solid. The suspension is stirred at -5° C. for 4 hours at which time a solution of N-[(1-aminobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine n-butyl ester monohydrochloride (244 mg, 0.606 mmole) in tetrahydrofuran (2.0 mL) containing N-methylmorpholine (65.0 mg, 0.640 mmole) is added dropwise. This mixture is stirred at -5° C. for several hours and then allowed to warm to room temperature overnight. To this is added ethyl acetate (15 mL) and water (8 mL). The layers are separated and the organic layer is washed with saturated sodium bicarbonate solution, 1 N hydrochloric acid, water and brine and dried over anhydrous magnesium sulfate. After separation of the solids by filtration the filtrate is evaporated in vacuo to yield crude product as a white solid which can be recrystallized from methanol/water to obtain pure N-[(1-(1-(2-(S)-bromo-3-methyl-1-oxobutyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine n-butyl ester, m.p. 126°-127° C.

N-[(1-(1-(1,1-dimethylethoxy)carbonyl)amino)-1-cyclopentyl)-1-cyclopentyl]-O-methyl-L-tyrosine butyl ester is prepared similarly to the ethyl ester as described below.

L-Tyrosine (1.00 kg, 5.52 mmole) is suspended in 2B anhydrous ethanol (3.00 kg). Anhydrous hydrogen chloride is introduced into this suspension initially at ambient temperature for 2.5 hours at which time the temperature rises to 56° C. The resulting clear solution is refluxed for 3 hours with continued introduction of a slow stream of hydrogen chlo-



R<sub>3</sub> represents hydrogen, lower alkanoyl, methoxy-lower alkanoyl, benzoyl or pyridylbenzoyl;  
R<sub>4</sub> represents hydrogen, lower alkyl, benzyl or benzyl substituted by hydroxy, halo, lower alkyl, acyloxy, lower alkoxy or trifluoromethyl;

COOR<sub>2</sub> represents carbonyl, lower alkoxy-carbonyl, benzyl-carbonyl, pyridylbenzyl-carbonyl, α-(lower alkoxy-carbonyl), lower alkoxy-carbonyl, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

9. A compound according to claim 6 wherein R<sub>1</sub> represents phenyl or phenyl substituted by hydroxy, acyloxy derived from a carboxylic acid, halo or lower alkoxy; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxy-lower alkanoyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents lower alkyl, benzyl or benzyl substituted by hydroxy, halo, lower alkyl, lower alkoxy, lower alkoxy or trifluoromethyl; COOR<sub>2</sub> represents carbonyl, lower alkoxy-carbonyl, benzyl-carbonyl, pyridylbenzyl-carbonyl, α-(lower alkoxy-carbonyl), lower alkoxy-carbonyl, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10. A compound according to claim 7 wherein R<sub>1</sub> represents phenyl or phenyl substituted by hydroxy, acyloxy derived from a carboxylic acid, halo or lower alkoxy; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxy-lower alkanoyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents lower alkyl, benzyl or benzyl substituted by hydroxy, halo, lower alkyl, lower alkoxy, lower alkoxy or trifluoromethyl; COOR<sub>2</sub> represents carbonyl, lower alkoxy-carbonyl, benzyl-carbonyl, pyridylbenzyl-carbonyl, α-(lower alkoxy-carbonyl), lower alkoxy-carbonyl, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

11. A compound according to claim 8 wherein R<sub>1</sub> represents phenyl or phenyl substituted by hydroxy, acyloxy derived from a carboxylic acid, halo or lower alkoxy; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxy-lower alkanoyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents lower alkyl, benzyl or benzyl substituted by hydroxy, halo, lower alkyl, lower alkoxy, lower alkoxy or trifluoromethyl; COOR<sub>2</sub> represents carbonyl, lower alkoxy-carbonyl, benzyl-carbonyl, pyridylbenzyl-carbonyl, α-(lower alkoxy-carbonyl), lower alkoxy-carbonyl, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

12. A compound according to claim 6 wherein R<sub>1</sub> represents 4-hydroxyphenyl, 4-acyloxyphenyl, 4-fluorophenyl or 4-methoxyphenyl; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxybenzyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents isopropyl; and COOR<sub>2</sub> represents carbonyl or lower alkoxy-carbonyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. A compound according to claim 7 wherein R<sub>1</sub> represents 4-hydroxyphenyl, 4-acyloxyphenyl, 4-fluorophenyl or 4-methoxyphenyl; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxybenzyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents isopropyl; and COOR<sub>2</sub> represents carbonyl or lower alkoxy-carbonyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

14. A compound according to claim 8 wherein R<sub>1</sub> represents 4-hydroxyphenyl, 4-acyloxyphenyl or 4-methoxyphenyl; R<sub>2</sub> represents hydrogen, methoxybenzyl or lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents isopropyl; and COOR<sub>2</sub> represents carbonyl or lower alkoxy-carbonyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15. A compound according to claim 12 wherein R<sub>1</sub> represents 4-hydroxyphenyl, 4-methoxyphenyl, 4-(thienyl)-carbonyloxyphenyl, 4-(pyridylbenzyl)-oxyphenyl, 4-(lower alkoxy-carbonyloxy)phenyl; R<sub>2</sub> represents lower alkanoyl; R<sub>3</sub> represents isopropyl; and COOR<sub>2</sub> represents lower alkoxy-carbonyl.

16. A compound according to claim 6 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl.

17. A compound according to claim 6 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> is hydrogen, R<sub>3</sub> is hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

18. A compound according to claim 6 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-(2-methoxyacetoxy)phenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl.

19. A compound according to claim 7 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-hydroxyphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen and R<sub>4</sub> is isopropyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20. A compound according to claim 6 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> is ethyl, R<sub>3</sub> is acetyl and R<sub>4</sub> is isopropyl.

21. A compound according to claim 6 of formula III wherein R<sub>1</sub> is 4-methoxyphenyl, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen, and R<sub>4</sub> is isopropyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

22. A method for the treatment of cardiovascular disorders comprising hypertension, edema, salt retention and congestive heart failure, said method of treatment comprising administering to a mammal in need thereof an effective amount of a compound of claim 1 or of a compound of claim 1 in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers.

23. A method according to claim 22 for the treatment of hypertension.

24. A pharmaceutical composition for the treatment of cardiovascular disorders comprising an effective amount of a compound of claim 1 in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers.

25. A method for the treatment of hypertension comprising administering to a mammal in need thereof an effective amount of a compound of claim 20 or of a compound of claim 20 in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers.

26. A pharmaceutical composition for the treatment of cardiovascular disorders comprising an effective amount of a compound of claim 20 in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers.

\* \* \* \* \*

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

202075  
Bogotá, D.C.,

Abogado  
**JIMENA ESCOBAR URIBE.**

|        |            |                       |
|--------|------------|-----------------------|
| ASUNTO | Radicación | 03105928-Divisional 1 |
|        | Trámite    | 002                   |
|        | Evento     | 001                   |
|        | Actuación  | 430                   |
|        | Oficio     | Nº 1 4 9 9 6          |
|        | Folios     | 023                   |

|                                 |                                     |                               |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Patente de Invención            | <input checked="" type="checkbox"/> | Patente de Modelo de Utilidad | <input type="checkbox"/>            |
| Vía Nacional                    | <input type="checkbox"/>            |                               |                                     |
| Vía PCT (fase nacional)         | <input type="checkbox"/>            | Cap. I                        | <input type="checkbox"/>            |
|                                 |                                     | Cap. II                       | <input checked="" type="checkbox"/> |
| No. Sol. Internacional          | PCT/EP02/05293                      |                               |                                     |
| Fecha de Presentación Internal. | 14 de Mayo de 2002                  |                               |                                     |

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

**1. Documentos estudiados**

- 1.1. Descripción: Folios: 5 a 83 (como se radicó inicialmente)
- 1.2. Reivindicaciones: Folios: 84 a 92 (como se radicó inicialmente)
- 1.3 Prioridad: Folios: 1 a 1 (15 de Mayo 2001, US 60/291.088).  
(11 de Diciembre 2001, US60/339.575).

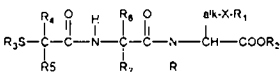
**Se acepta para estudio la divisional-1.**

**2 Objeto de la invención**

- Título de la solicitud: Derivados de dipéptido que contienen un grupo 2-Tioacilo N-Terminal como inhibidores de vasopectidasa.

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en:  
Compuestos derivados de dipéptido que contienen un grupo 2-Tioacilo N-Terminal.

Reivindicaciones 1-9 : Compuesto de la fórmula (I):



Reivindicación 10 : Una composición farmacéutica.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de compuestos inhibidores de vasopeptidasa, que son útiles como inhibidores dobles tanto de la de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) , de la endopeptidasa neutra ( NEP) y adicionalmente de la endotelina ( ECE).

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona compuestos de fórmula (I), procedimientos para su preparación y composiciones farmacéuticas .

La presente solicitud comprende el uso de compuestos en el tratamiento y/o prevención de desórdenes cardiovasculares , arteriosclerosis, dolor, depresión , enfermedades de tipo psicótico, desórdenes gastrointestinales, lesiones de tipo cerebral como embolias, obesidad y disfunción eréctil entre otras.

El objeto de la invención definido anteriormente se clasifico de acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) : A61P9/12, C07K5/06, A61K31/198, A61K38/04.

3. De la solicitud de Patente

3.1 Reivindicaciones (artículo 30 D 486).

- Las reivindicaciones 3-9, no son claras ya que se esta reclamando a R6 y R7 como alquilos idénticos de 1- 4 átomos de carbono( más específicamente como grupos metilo).y estas al ser dependientes de la reivindicación 1 (en donde se reclama que R6 y R7 en combinación forman un cicloalquilideno de 5- 6 átomos) no serían congruentes.

Por este motivo esta divisional sigue siendo afectada por los documentos estudiados en el numeral 4, ya que según la materia reclamada siendo R6 y R7 siendo alquilo o juntos cicloalquileno presentan la misma actividad.

4. Determinación del Estado de la Técnica

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es 15 de Mayo de 2001, se consultaron las bases de datos y los archivos con que cuenta la entidad con fecha de publicación anterior y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud :

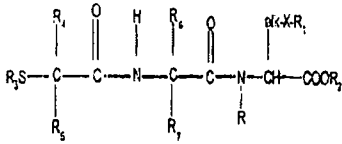
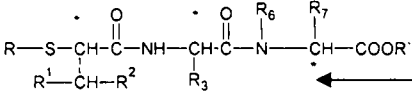
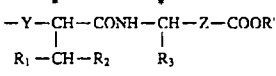
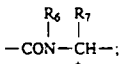
| Nº | Documento | Título                                                                                                                         | Fecha de Publicación* |
|----|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| D1 | US5591891 | N-[Mercaptoacyl ( aminoacid or peptide)] compounds and S-Lipophilic aliphatic carbonyl derivates thereof as antihypertensives. | 7 deEnero de 1997.    |
| D2 | US5506244 | Cyclic aminoacid derivates                                                                                                     | 9 de Abril de 1996    |

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

5.1 Nivel inventivo (artículo 18 D486)

Para entender mejor el concepto y los los argumentos expuestos por este despacho se realizará los siguientes cuadros comparativos:

Cuadro 1.

|                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>SOLICITUD EN ESTUDIO</div> <div></div>                                       | <div>SUSTITUCIONES</div> <div>Según la reivindicación 1. Capítulo reivindicatorio folios 84-92.</div> <div>R3 es hidrógeno o acilo.</div> <div>R4 es hidrógeno, alquilo C1-7 opcionalmente sustituido, oxacicloalquilo C3-7, oxacicloalquilo C3-7-alquiloC1-7, (arilo carbocíclico o heterociclo)-alquiloC1-7.</div> <div>R5 es hidrógeno</div> <div>ó R4 y R5 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman cicloalquilideno de 5- 6 átomos de carbono.</div> <div>R6 y R7 representan alquilo de C1-7.</div> <div>R Representa hidrógeno.</div> <div>Alk es alquilenos de C1-7</div> <div>X es -O- o S(O)n y n es 0 o 2.</div> <div>R1 es alquilo C1-7, cicloalquilo de C1-7, arilo carbocíclico o heterocíclico, (arilo carbocíclico o heterocíclico) -alquilo C1-7.</div> <div>COOR2 es un carboxilo o carboxilo de un éster farmacéuticamente aceptable.</div>                       |
| <div>DOCUMENTO D1</div> <div>R-S-X</div> <div></div> <div>Compuesto 1(a).</div> | <div></div> <div>X es</div> <div>Y es un <u>enlace</u> o CH2.</div> <div></div> <div>Z es</div> <div>con estas sustituciones se forma el compuesto de formula que denominaremos (1a)</div> <div>En donde :</div> <div>R es hidrogeno, acilo.</div> <div>R1 es hidrógeno o alquilo .</div> <div>R2 es hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, alcoxi, alcoxi-alquilo bajo o aralquiloxi.</div> <div>R3 es hidrógeno, alquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, o -CH(R4)(R5)- en donde R4 se define como R1 y R5 como R2.</div> <div>R6 es hidrógeno o alquilo.</div> <div>R7 es cicloalquilo, aralquilo, ariloxi-alquilo bajo , o alcoxi-alquilo bajo.</div> <div>R' es hidrógeno, alquilo, aralquilo, acilo, aroilo.</div> |
| <div>DOCUMENTO D2</div>                                                                                                                                            | <div>Según la reivindicación 1 folios 174-175</div> <div>R3 es hidrógeno o acilo.</div> <div>R4 es hidrógeno, alquilo bajo, arilo carbocíclico o heterocíclico, arilo carbocíclico o heterocíclico-bajo alquilo, cicloalquilo, cicloalquilo-alquilo bajo, biarilo o biarilo- alquilobajo.</div> <div>R5 es hidrógeno o bajo alquilo,</div> <div>ó R4 y R5 juntos representan cicloalquilideno o cicloalquilideno benzofusionado.</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |



| <u>La prueba Invivo para inhibición ACE</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <u>La prueba Invivo para inhibición ACE</u> |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|----|-------|----|-----------|----|-------|----|--------|----|-------|----|-------|----|-------|----|--------|----|-----------|----|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Ejemplo 6(a) : Inhibe la respuesta presora inducida por angiotensina I durante 3 horas en una dosis de 10 mg/Klg I.V.</p> <p>Ejemplo 1(a) : Inhibe la respuesta presora inducida por angiotensina I durante 6 horas en una dosis de 11.8 mg/Kg oralmente.</p> <p><u>Inhibición invitro de NEP:</u></p> <p><u>IC<sub>50</sub> 0.1- 50 nM</u></p> <p>Ejemplo 6(a) <u>5 nM</u></p> | <table><tr><th><u>Ejemplos</u></th><th><u>IC<sub>50</sub> (nM) NEP</u></th></tr><tr><td>19</td><td>5 ± 2</td></tr><tr><td>20</td><td>3.2 ± 0.3</td></tr><tr><td>21</td><td>5 ± 2</td></tr><tr><td>22</td><td>18 ± 2</td></tr><tr><td>23</td><td>3 ± 2</td></tr><tr><td>24</td><td>3 ± 1</td></tr><tr><td>25</td><td>5 ± 2</td></tr><tr><td>26</td><td>10 ± 1</td></tr><tr><td>27</td><td>1.4 ± 0.2</td></tr><tr><td>28</td><td>4.5 ± 0.5</td></tr></table> <p>Los compuestos como inhiben el NEP por consiguiente regulan el péptido natriuretico auricular el cual esta implicado en la regulación de la presión arterial Por inhibición de NEP hay un aumento de la diuresis y natriuresis.</p> | <u>Ejemplos</u>                             | <u>IC<sub>50</sub> (nM) NEP</u> | 19 | 5 ± 2 | 20 | 3.2 ± 0.3 | 21 | 5 ± 2 | 22 | 18 ± 2 | 23 | 3 ± 2 | 24 | 3 ± 1 | 25 | 5 ± 2 | 26 | 10 ± 1 | 27 | 1.4 ± 0.2 | 28 | 4.5 ± 0.5 | <p>Ejemplo 1(b) . Inhibe la respuesta presora inducida por la angiotensina I durante 6 horas a una dosis de 10 mg/Kg por via oral</p> <p><u>Inhibición invitro de NEP:</u></p> <p>Ejemplo 2a <u>IC<sub>50</sub> 2 nM.</u></p> <p>Ejemplo 2i <u>IC<sub>50</sub> 2.2 nM.</u></p> <p>Los compuestos como inhiben el NEP por consiguiente potencian los efectos cardiovasculares de los factores natriuréticos auriculares (ANF) lo que conduce a un aumento de la diuresis y natriuresis.</p> |
| <u>Ejemplos</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <u>IC<sub>50</sub> (nM) NEP</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 19                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5 ± 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3.2 ± 0.3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 21                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5 ± 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 18 ± 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3 ± 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3 ± 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5 ± 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10 ± 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 27                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1.4 ± 0.2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 4.5 ± 0.5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                             |                                 |    |       |    |           |    |       |    |        |    |       |    |       |    |       |    |        |    |           |    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

El documento del estado de la técnica mas cercano es D1 ( Folio 138 col. 1, Folio141 col 18 líneas 40-65) ) que enseña Compuestos de N-[Mercaptoacil(aminoácido o péptido)] y derivados S –alifáticos carbolinilicos utilizados como antihipertensivos, su proceso de preparación, su uso en medicamentos y en particular su uso como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP).

La diferencia con D1 es que en la actual solicitud los compuestos derivados de dipéptido que contienen un grupo 2-Tioacilo N-Terminal , **el carbono que sostiene a los radicales R6 y R7 combinados ( equivalente al carbono que sostiene a R3 en la anterioridad ) forman un cicloalquilideno de 5 o 6 miembros**

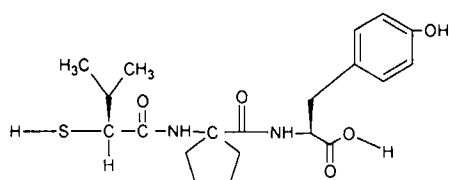
Esta diferencia no parece conceder un efecto técnico inesperado ò una ventaja a los compuestos reivindicados en comparación con los compuestos del Estado de la Técnica más cercano ( Ver folio 142, tabla III); porque estos compuestos **no parecen tener un efecto inhibitor superior sobre la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP)** ( Ver folios 21-35).

Si observamos detenidamente el grupo farmacofòrico ( Cuadro 2) para la actual solicitud como para los documentos que afectan su nivel inventivo es igual , es decir la actividad esta centrada sobre dicho grupo. Ahora una persona versada medianamente en la materia puede observar que la naturaleza de los sustituyentes puede variar sobre dicho grupo farmacofòrico con el fin de obtener más compuestos en donde la actividad no se ve afectada . Màs específicamente si observamos en D1 efectivamente el carbono que esta sustituido por R3 es terciario ( el cual equivale al de la actual solicitud el cual se encuentra sustituido por los radicales R6 y R7 para formar un carbono cuaternario ) . D2 muestra que el carbono que esta sustituido por A en donde A es un cicloalquilideno ,es cuaternario . Por lo que para el experto en la materia resulta evidente combinar las enseñanzas de los dos documentos con el fin de obtener los compuestos reivindicados sin perder la actividad farmacològica ( Ver cuadros 1 y 2 ) . D1 adicionalmente muestra en el folio 140 columnas 13 y 14 tabla I línea 9 que X puede ser Oxigeno o S ( es decir cuando en la actual solicitud S(O)n n es 0).

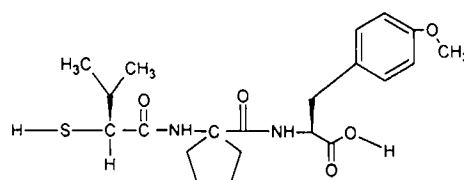
Ahora si nos remitimos a las pruebas farmacológicas ( Cuadro 3) que sustentan la invención encontramos lo siguiente:

- En cuanto a lo enunciado en la página 17 de la descripción en donde se habla de que la dosificación invitro que puede ser de concentraciones entre 10<sup>-6</sup> molar y 10<sup>-9</sup> molar y la dosificación invivo puede ser entre 0.01 y 50 mg/Kg dependiendo de la via de administración- , esta dosificación se encuentra descrita en D2 ( Folio 146, columna 7, líneas 8-12).
- En el análisis de los datos reportados para los ensayos invitro de ACE e invitro NEP encontramos lo siguiente :

Los compuestos 2a y 2i referenciados en la anterioridad, para el ensayo in Vitro ACE presentan un IC<sub>50</sub> de 7nM y 19nM ( folio 146 , columna 7 , líneas 36-38) mientras que para el ensayo NEP presentan un IC<sub>50</sub> de 2.0nM y 2.2 nM ( folio 146, columna 8, líneas 25-27) y se encuentran representados por las siguientes estructuras.

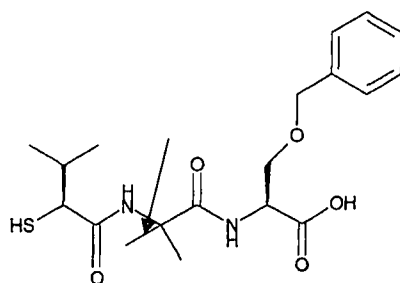


Compuesto 2a



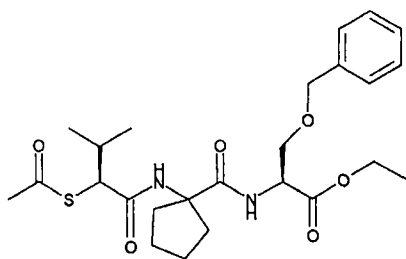
Compuesto 2i

Si comparamos estos datos con los datos reportados para los mismos ensayos en la actual solicitud donde el IC<sub>50</sub> para el ensayo invitro ACE se encuentra en un rango de ( 0.1 a 50nM y más específicamente para el compuesto 6(a) en el que el IC<sub>50</sub> es de 20nM) y el IC<sub>50</sub> para el ensayo invitro NEP se encuentra en un rango de ( 0.1 a 50nM y más específicamente para el compuesto 6(a) en el que el IC<sub>50</sub> es de 5 nM y en donde dicho compuesto 6(a) esta representado por la estructura



Compuesto 6a

Dichos datos no son significamente diferentes y permiten concluir de manera clara que la actividad farmacológica se encuentra centrada en el grupo farmacofórico el cual es el mismo tanto para la anterioridad como para los compuestos reivindicados . Ahora si observamos en el aparte descriptivo ( Folios 7-8) y sus respectivos ejemplos ( ver ejemplo 6b ) el cual esta representado por la estructura :



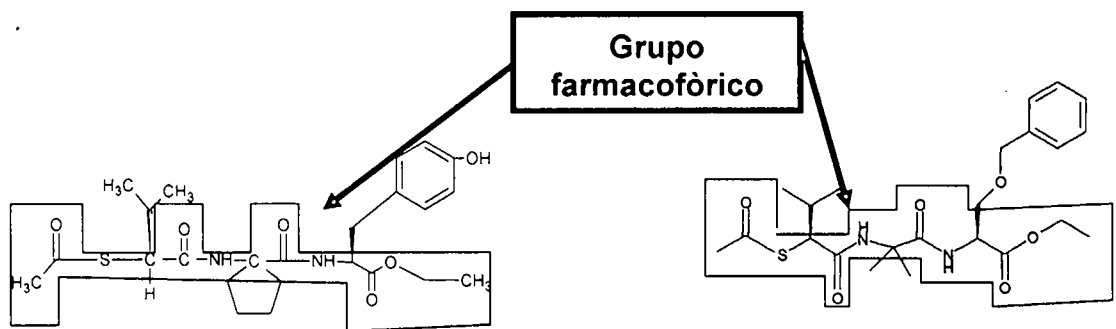
Compuesto (6b)

los sustituyentes denominados R6 y R7 pueden ser dos grupos alquilo( en este caso metilos como en el ejemplo 6 (a)) o juntos pueden formar un grupo cicloalquilideno ( en el caso del ejemplo 6b). Es decir que cualquiera de las dos sustituciones se pueden dar, por lo que se concluye que la actividad farmacológica para estas es equivalente en falta de evidencia de lo contrario..

- Para la determinación invivo para la inhibición ACE encontramos lo siguiente :

El compuesto 1(b) de la anterioridad ( Folio 146, columna 7 , líneas 57-59; folio 170, columna 16 , líneas 8-10)) inhibe la respuesta presora inducida por la angiotensina I durante 6 horas a una dosis de 10 mg/Kg por vía oral y el compuesto 1(a) de la actual solicitud ,inhibe la respuesta presora inducida por angiotensina I durante 6 horas en una dosis de 11.8 mg/Kg oralmente.

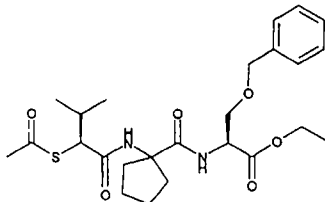
Los compuestos 1(b) y 1(a) se encuentran representados por las siguientes estructuras.



Compuesto 1b de la anterioridad D2

Ejemplo 1(a) de la solicitud.

Estos datos no son significativamente diferentes y nuevamente nos corrobora que la actividad farmacológica se encuentra centrada en el grupo farmacofórico el cual es el mismo tanto para la anterioridad como para los compuestos reivindicados . Ahora si observamos en el aparte descriptivo ( Folios 7-8) y sus respectivos ejemplos ( ver ejemplo 5 ) el cual esta representado por la estructura :



Ejemplo 5 de la solicitud.

los sustituyentes denominados R6 y R7 pueden ser dos grupos alquilo( en este caso metilos como en el ejemplo 1 (a)) o juntos pueden formar un grupo cicloalquilideno (

en el caso del ejemplo 5). Es decir que cualquiera de las dos sustituciones se pueden dar, por lo que se concluye que la actividad farmacológica para estas es equivalente en falta de evidencia de lo contrario.

- En cuanto al incremento de los niveles de ANF en plasma D1 en el folio 141, columna 18, líneas 52- 67 y , columna 19 , líneas 1-9 y en D2 en el folio 145, columna 6 , líneas 60-67 , nos enseña que los compuestos demuestran que por inhibición de la endopeptidasa neutra se potencian los efectos cardiovasculares de los factores natriuréticos auriculares (ANF) lo que conduce a un aumento de la diuresis y natriuresis, lo que hace que este efecto combinado sea beneficioso en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares como la hipertensión y falla cardíaca congestiva. No hay evidencia que demuestre que los compuestos que se reivindican incrementen los niveles de ANF en plasma , con un resultado inesperado o sorprendente respecto a los compuestos divulgados en D1 y D2.

Y por último si tenemos en cuenta adicionalmente ( Cuadro 3 ) los datos dados para D1 en el folio 142 columnas 31 y 32, tanto en el ensayo de inhibición para el NEP como para el ACE, dichos datos se encuentran dentro del rango establecido para los compuestos de la actual solicitud por lo tanto no hay una ventaja técnica sobre estos.

Así que el Problema Técnico planteado en esta solicitud : La necesidad de compuestos derivados de dipéptido que contienen un grupo 2-Tioacilo N-Terminal como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP), útiles el tratamiento y/o prevención de desórdenes cardiovasculares , arteriosclerosis, dolor, depresión, enfermedades de tipo psicótico, desórdenes gastrointestinales, lesiones de tipo cerebral como embolias, obesidad y disfunción eréctil entre otras, se había solucionado previamente mediante los compuestos derivados de dipéptidos divulgados en D1 y D2

De manera que los nuevos compuestos **son una alternativa a los compuestos conocidos** porque no presentan un efecto inhibitor superior de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP).

El experto en la materia, en vista del Estado de la Técnica en su totalidad, es decir en vista de D1 y D2 (Folios 144 a 151, que enseña compuestos derivados de cicloaminoácidos con actividad farmacológica caracterizada por ser inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) como de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP)), hubiera sugerido sin mucho esfuerzo de su parte, modificar el carbono que sostiene a R3 de D1 por el grupo cicloalquilideno de 5 a 6 divulgado en D2 , con el fin de lograr los compuestos derivados de dipéptido que contienen un grupo 2-Tioacilo N-Terminal reivindicados, que no parecen tener un efecto inhibitor superior de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de la enzima endopeptidasa neutra ( NEP).

Por todo lo anterior se puede concluir , que para la persona experta en la materia y que se enfrenta al problema de proporcionar de compuestos inhibidores de vasopectidasa, que son útiles como inhibidores dobles tanto de la de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) , de la endopeptidasa neutra ( NEP) el experto puede homologar los compuestos de la presente solicitud a los del estado del arte previo (D1 y D2), haciendo diferentes sustituciones sobre el grupo farmacofórico (común a todas ellas) ya que dichas sustituciones no aportan ninguna ventaja técnica o efecto inesperado adicional .

Por lo cual se consideran obvios para el experto en la materia. En consecuencia, carecen de nivel inventivo.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto reivindicado (reivindicación 10), no tiene nivel inventivo porque el componente que lo caracteriza no es inventivo.

## 7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

| N° | Documento N° | Reivindicaciones afectadas | Requisito que afecta |
|----|--------------|----------------------------|----------------------|
| D1 | US5591891    | 1-10                       | Nivel inventivo      |
| D2 | US5506244    | 1-10                       | Nivel inventivo      |

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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

**ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL**  
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 28 NOV. 2008

|                                     |                                               |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>CONCEPTO TÉCNICO No.</b><br>2275 | <b>EXAMINADOR TÉCNICO</b><br>Código No.202075 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|