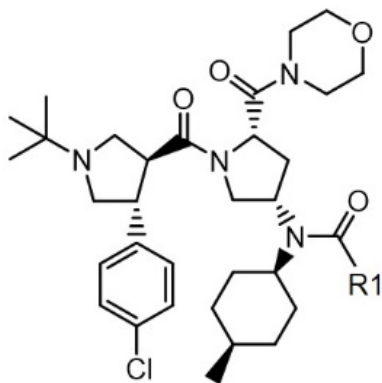


AGONISTAS DE RECEPTOR DE MELANOCORTINA-4

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona a un compuesto que exhibe excelente actividad agonista contra receptores de melanocortina. Más específicamente, la presente invención se relaciona a un compuesto de la siguiente Fórmula 1, una composición farmacéutica que comprende el compuesto como un ingrediente activo, y un uso del mismo, y el compuesto de la presente invención exhibe excelente actividad agonista contra receptores de melanocortina-4 y pueden ser particularmente útiles en prevenir o tratar la obesidad, diabetes, inflamación y disfunción eréctil:

[Fórmula 1]



en donde R1 es alquilo de C₂-C₅.

TÉCNICA ANTECEDENTE

La proteína leptina es una hormona secretada por células grasas del cuerpo (adipocitos), y la cantidad de secreción de la misma se incrementa conforme aumenta el contenido de grasa corporal. La proteína leptina regula las

funciones de varios neuropéptidos producidos en el hipotálamo, para de esta manera regular el apetito, el contenido de grasa corporal, y varias funciones *in vivo* que incluyen metabolismo de energía (Schwartz, y colaboradores, Nature 404, 661-671
5 (2000)). La transducción de señal de apetito y control de peso por la proteína leptina se hace a través de la regulación de muchos factores corriente abajo, los más representativos de los cuales son melanocortina, péptido relacionado a agutí (AgRP), y la hormona de neuropéptido Y (NPY).

10 Cuando la concentración de leptina en la sangre se incrementa como un resultado de calorías excesivas *in vivo*, la secreción de la hormona de proteína proopiomelanocortina (POMC) en la glándula pituitaria se aumenta, y la producción de AgRP y NPY disminuye. Alfa-MSH (hormona estimuladora de melanocito),
15 que es una hormona de péptido pequeño, se produce de neuronas POMC, y esta hormona es un agonista del receptor de melanocortina-4 (MC4R) de neuronas secundarias y finalmente induce reducción del apetito. Por otra parte, cuando la concentración de leptina disminuye debido a la deficiencia de
20 calorías, la expresión de AgRP—que es el antagonista MC4R—se incrementa y la expresión de NPY también se aumenta, esto finalmente aumenta el apetito. Es decir, dependiendo de los cambios en la leptina, la hormona alfa-MSH y la hormona AgRP se involucran en la regulación del apetito al ser un agonista y
25 antagonista para MC4R.

La hormona alfa-MSH induce varias respuestas fisiológicas al enlazar a los 3 subtipos MCR además de MC4R. Hasta ahora, cinco subtipos MCR se han identificado. Entre los subtipos, es conocido que MC1R se expresa principalmente en las células de la piel y se involucra en la pigmentación de melanina, MC2R se expresa principalmente en la glándula adrenal y se involucra en la producción de la hormona glucocorticoide, y solamente ACTH (hormona adrenocorticotrópica) derivada de POMC es el ligando de los mismos. MC3R y MC4R—que se expresan principalmente en el sistema nervioso central—se involucran en la regulación del apetito, metabolismo de energía, y la eficiencia de almacenamiento de grasa en el cuerpo, y MC5R—que se expresa en varios tejidos—se conoce que regula la función exocrina (Wikberg, y colaboradores, Pharm Res 42 (5) 393-420 (2000)). Específicamente, la activación del receptor MC4R tiene un efecto de efectivamente reducir el peso corporal al inducir una disminución en el apetito y un incremento en el metabolismo de energía y de esta manera se propone que es un punto mayor de acción en el desarrollo de fármacos contra obesidad (Review: Wikberg, Eur. J. Pharmacol 375, 295-310 (1999)); Wikberg, y colaboradores, Pharm Res 42 (5) 393-420 (2000); Douglas y colaboradores, Eur J Pharm 450, 93-109 (2002); y O’Rahilly y colaboradores, Nature Med 10, 351-352 (2004)).

La función de MC4R en el apetito y control de peso se ha demostrado principalmente a través de un experimento en un

modelo de animal de la expresión anormal de la proteína de agutí (ratón agutí). En el caso de ratones agutí, se encuentra que la proteína de agutí se expresa en altas concentraciones en el sistema nervioso central y actúa como un antagonista de MC4R en el hipotálamo debido a mutaciones genéticas, induciendo de esta manera obesidad (Yen, TT y colaboradores, FASEB J. 8, 479-488 (1994); y Lu D., y colaboradores, Nature 371, 799-802 (1994)). En los resultados de investigación subsecuentes, se observa que AgRP (péptido relacionado a agutí) similar a la proteína de agutí actual se expresó en el nervio hipotalámico, y AgRP también se conoce que está involucrado en la regulación del apetito como antagonistas contra MC4R (Shutter, y colaboradores, Genes Dev., 11, 593-602 (1997); y Ollman, y colaboradores, Science 278, 135-138 (1997)).

La administración cerebral de alfa-MSH—que es un agonista MC4R *in vivo*—a un animal exhibe un efecto de reducir el apetito, y si SHU9119 (péptido) o HS014 (péptido)—que son antagonistas MC4R—se tratan a los mismos, un efecto para incrementar el apetito nuevamente se observa (Kask y colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Comm. 245, 90-93 (1998)). Además, en una prueba de animal utilizando Melanotan II (MTII, Ac-Nle-c[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys]-NH₂) y HP228, que es un agonista similar al mismo, después de la administración cerebral, intraperitoneal o subcutánea, se confirmaron la supresión de apetito, pérdida de peso y la eficacia de

incremento de metabolismo de energía, y los similares. (Thiele T. E., y colaboradores, *Am J Physiol* 274 (1 Pt 2), R248-54 (1998); Lee M. D., y colaboradores, *FASEB J* 12, A552 (1998); Murphy B., y colaboradores, *J Appl Physiol* 89, 273-82 (2000)).

5 En contraste, cuando el SHU9119 representativo se administra a un animal, se exhiben ingesta de alimento significativa y sostenida y ganancia de peso, que proporciona la evidencia farmacológica de que los agonistas MCR se pueden utilizar para tratar obesidad. El efecto reductor del apetito—que es
10 evidentemente exhibido durante la administración de MTII—no es exhibido en ratones MC4R KO (inactivados), y este resultado experimental prueba nuevamente que el efecto reductor del apetito se logra principalmente por la activación de MC4R (Marsh, y colaboradores, *Nat Genet* 21, 119-122 (1999)).

15 Los inhibidores de apetito que actúan en el sistema nervioso central son predominantes como tratamientos de la obesidad desarrollados hasta la fecha, y la mayoría de los inhibidores son fármacos que modulan la acción de los neurotransmisores. Ejemplos de los mismos incluyen agentes de
20 noradrenalina (fentermina y mazindol) y fluoxetina y sibutramina, que son agentes serotoninérgicos. Sin embargo, el modulador de neurotransmisor ejerce un amplio intervalo de efectos en varias acciones fisiológicas además de la supresión del apetito por numerosos receptores de subtipo. Por lo tanto,
25 los moduladores carecen en selectividad para cada subtipo y

tiene una gran desventaja de que varios efectos secundarios están acompañados en el caso de la administración a largo plazo.

Por otra parte, las melanocortinas son neuropéptidos,
5 no neurotransmisores, y considerando que todas las otras funciones diferentes del metabolismo de energía son normales en los ratones KO del gen MC4R, los agonistas de melanocortina tienen una ventaja como un punto de acción en que solamente la pérdida de peso a través de la inhibición del apetito se puede
10 inducir sin afectar otras funciones fisiológicas. En particular, el receptor es un receptor acoplado a la proteína G (GPCR), que pertenece a la categoría mucho más exitosa entre los nuevos puntos de acción de fármaco desarrollados hasta ahora, y es grandemente distinguido de los puntos de acción en
15 la técnica relacionada en que es relativamente fácil de asegurar la selectividad para los receptores de subtipo.

Como ejemplos para utilizar el receptor de melanocortina como un punto de acción, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 2008/007930 y WO 2010/056022 describen
20 compuestos como agonistas del receptor de melanocortina.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

PROBLEMA TÉCNICO

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto novedoso representado por la Fórmula 1, que tiene
25 excelente actividad agonista selectiva contra los receptores de

melanocortina, específicamente receptores de melanocortina-4 (MC4R), o una sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar el compuesto representado por la Fórmula 1.

Aun otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica agonística del receptor de melanocortina que comprende un compuesto representado por la Fórmula 1, o una sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo.

Aun otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso del compuesto representado por la Fórmula 1, o a sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo en la prevención o tratamiento de la obesidad, diabetes, inflamación y disfunción eréctil.

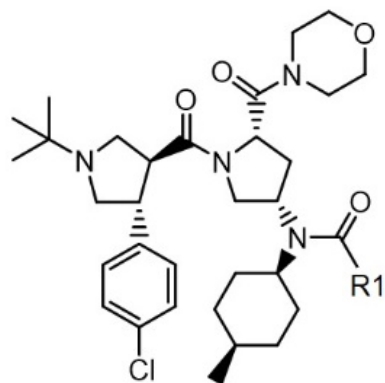
Aun otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para prevenir o tratar la obesidad, diabetes, inflamación y disfunción eréctil, que comprende administrar el compuesto representado por la Fórmula 1, o una sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto en necesidad del mismo.

SOLUCIÓN AL PROBLEMA

Para lograr el objetivo anterior, la presente

invención proporciona un compuesto de la siguiente Fórmula 1, o una sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



en donde R1 es alquilo de C₂-C₅.

El compuesto de la Fórmula 1 de acuerdo con la presente invención puede formar una sal farmacéuticamente aceptable.

Además, puesto que los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden tener un centro de carbono asimétrico y un eje asimétrico o un plano asimétrico, los compuestos pueden existir como isómeros cis o trans, isómeros R o S, racematos, mezclas de diastereómero, y diastereómeros individuales, y todos estos isómeros y mezclas se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

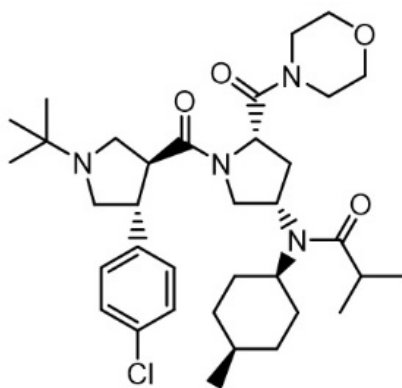
En la presente especificación, a menos de que sea indicado de otra manera, el compuesto de la Fórmula 1 se utiliza en el sentido de incluir todo del compuesto de la Fórmula 1, sales e isómeros farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una modalidad de acuerdo con la presente invención, R1 en la Fórmula 1 es alquilo de C₂ a C₄. En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, R1 en la Fórmula 1 es un alquilo de C₂ a C₄ lineal o ramificado, por ejemplo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o ter-butilo.

En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, R1 en la Fórmula 1 es alquilo de C₂ o C₃. En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, R1 en la Fórmula 1 es alquilo de C₂ o C₃ lineal o ramificado, por ejemplo etilo, n-propilo o isopropilo.

En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-ciclohexil)isobutiramida de la siguiente Fórmula 2:

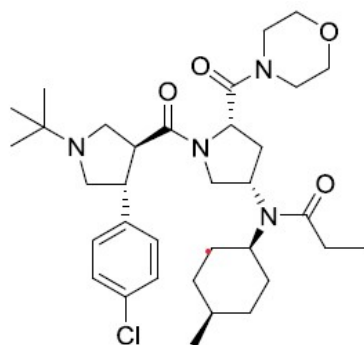
[Fórmula 2]



En otra modalidad de la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-

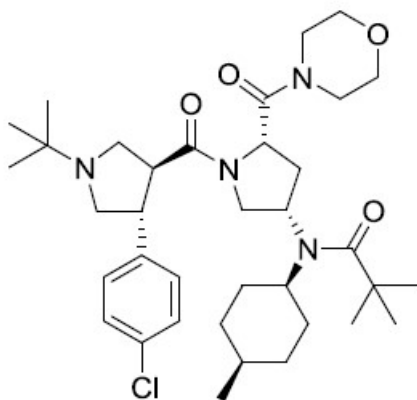
butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1*s*,4*R*)-4-metilciclohexil)-propionamida de la siguiente Fórmula 3:

[Fórmula 3]



En otra modalidad de la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1*s*,4*R*)-4-metilciclohexil)-pivalamida de la siguiente Fórmula 4:

[Fórmula 4]



En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales de adición de ácido formadas por un ácido

inorgánico tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloraacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalensulfónico, pero no está limitado a los mismos.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es etilo y la sal es un ácido inorgánico tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloraacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es n-propilo y la sal es un ácido inorgánico tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico

orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico
5 tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es isopropilo y la sal es un ácido inorgánico tales como ácido
10 clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido
15 láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es n-butilo y la sal es un ácido inorgánico tales como ácido
20 clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido
25 trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido

láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es isobutilo y la sal es un ácido inorgánico tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

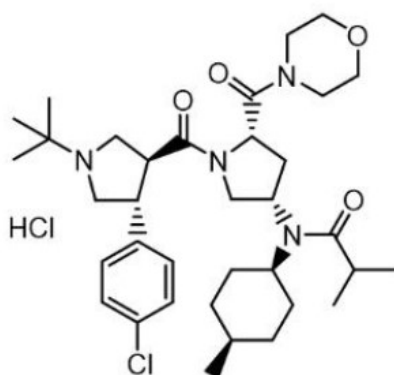
En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es sec-butilo y la sal es un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de la invención, el compuesto es una sal farmacéutica del compuesto de la Fórmula 1, en donde R1 es ter-butilo y la sal es un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido carboxílico orgánico tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico y ácido maleico; y ácido sulfónico tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, la sal farmacéuticamente aceptable es clorhidrato.

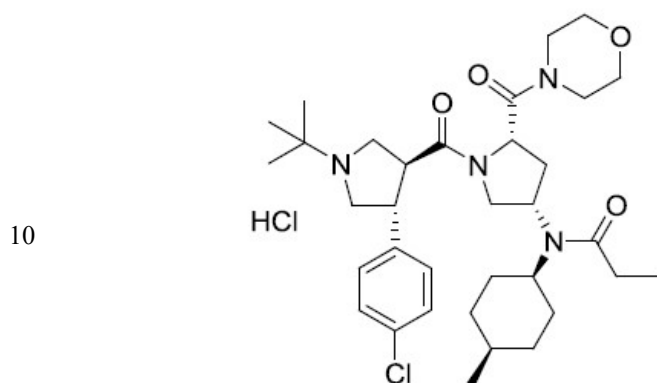
En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-ciclohexil)isobutiramida de la siguiente Fórmula 5:

[Fórmula 5]



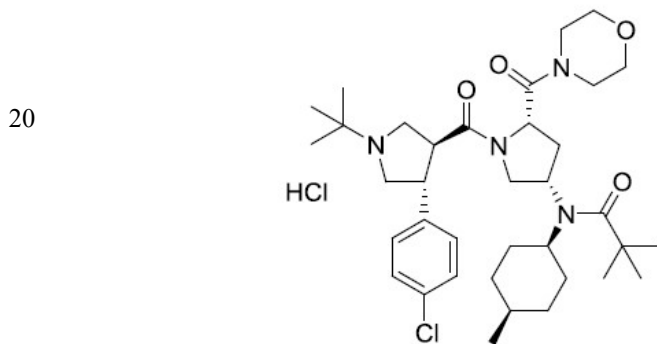
En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-ciclohexil)propionamida de la siguiente Fórmula 6:

[Fórmula 6]



En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la Fórmula 1 es clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamida de la siguiente Fórmula 7:

[Fórmula 7]

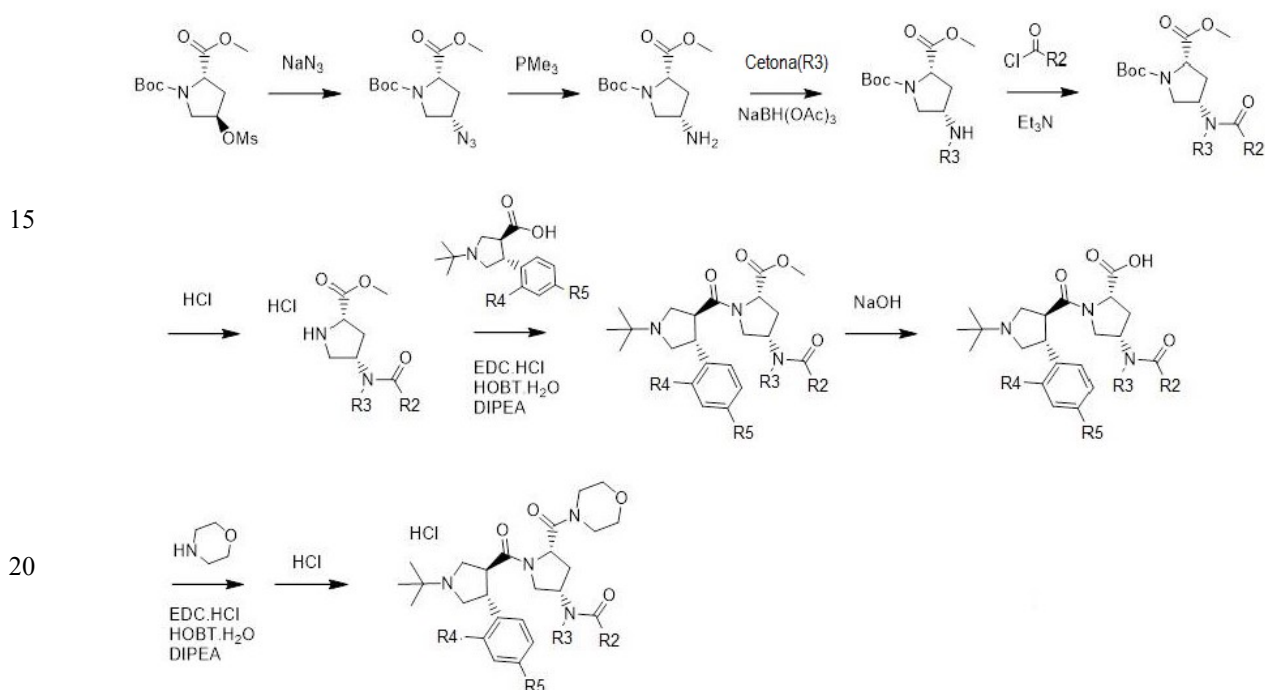


En otra modalidad de acuerdo con la presente invención, clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-

25

4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)-
 pirrolidin-3-il)-N-((1s,4R)-4-metilciclohexil)isobutiramida de
 la Fórmula 5 anterior, clorhidrato de N-((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-
 (ter-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-
 5 4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1s,4R)-4-metilciclohexil)-
 propionamida de la Fórmula 6 anterior, y clorhidrato de N-
 ((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-
 carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1s,4R)-4-
 metilciclohexil)pivalamida de la Fórmula 7 anterior se pueden
 10 preparar de acuerdo con el siguiente Esquema de Reacción 1.

[Esquema de Reacción 1]



En el Esquema de Reacción 1,

R2 es alquilo de C₁-C₅;

25 R3 es cicloalquilo de C₃-C₈ no sustituido o sustituido

con 1 o 2 alquilos de C_1-C_5 ; y

R4 y R5 son cada uno independientemente hidrógeno o halógeno.

El compuesto de la Fórmula 1 de acuerdo con la
5 presente invención exhibe excelente actividad agonista contra los receptores de melanocortina, específicamente receptores de melanocortina-4 (MC4R), y de esta manera la presente invención también proporciona una composición farmacéutica agonística del receptor de melanocortina que comprende el compuesto de la
10 Fórmula 1, o una sal o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En particular, la composición de acuerdo con la presente invención exhibe un excelente efecto en prevenir o tratar obesidad, diabetes, inflamación y disfunción
15 eréctil, pero no está limitado a los mismos.

En la presente especificación, el "portador" se refiere a un compuesto que facilita la inyección del compuesto en células o tejidos.

Cuando el compuesto de la presente invención se
20 administra para propósitos clínicos, la dosis diaria total que es administrada a un hospedero como una sola dosis o en dosis separadas está de preferencia en el intervalo de 0.01 a 10 mg por 1 kg del peso corporal, pero un nivel de dosis específico para pacientes individuales puede variar dependiendo del
25 compuesto específico que es utilizado, el peso, el sexo, el

estado de salud, y la dieta del paciente, el tiempo de administración, el método de administración, y la velocidad de excreción del fármaco, la mezcla de fármaco y la severidad de una enfermedad.

5 El compuesto de la presente invención se puede administrar por cualquier ruta dependiendo del propósito. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención se puede administrar mediante inyección o administración oral.

10 Las formulaciones para inyección se pueden producir al utilizar el agente de dispersión, agente humectante, o agente de suspensión adecuado de acuerdo con técnicas conocidas.

15 Ejemplos de formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, y gránulos, y las formas de dosificación sólida se pueden producir al mezclar el compuesto activo de la Fórmula 1 de acuerdo con la presente invención con uno o más portadores tales como diluyentes inertes, lubricantes, desintegrantes y aglutinantes.

20 **EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION**

 El compuesto de la Fórmula 1 de acuerdo con la presente invención exhibe excelente actividad agonista contra receptores de melanocortina, particularmente receptores de melanocortina-4 (MC4R), y de esta manera se pueden utilizar
25 útilmente en la prevención o tratamiento de obesidad, diabetes,

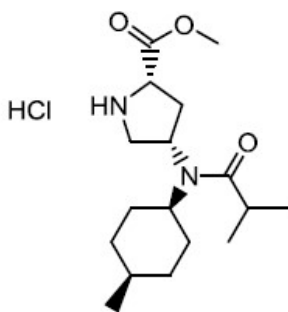
inflamación y disfunción eréctil.

El compuesto de la Fórmula 1 de acuerdo con la presente invención exhibe un efecto en el objetivo sobre el receptor de melanocortina-4, no efectúa ansiedad y depresión mientras que exhibe efectos de pérdida de peso y de reducción de dieta, y se puede administrar sin efectos secundarios en la inhibición del gen relacionado a éter-a-go-go (hERG) humano o problemas de seguridad tal como mutagénesis. Además, el compuesto de la Fórmula 1 de acuerdo con la presente invención se puede administrar de manera segura debido a que no hay citotoxicidad y toxicidad del hígado.

MODO PARA LA INVENCION

Después enseguida, la presente invención será descrita en más detalle a través de los ejemplos de preparación y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solamente ilustrativos, y el alcance de la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo de Preparación 1: Preparación de clorhidrato de (2S,4S)-4-(N-((1S,4R)-4-metilciclohexil)isobutiramido)-pirrolidin-2-carboxilato de metilo



El compuesto del título se obtuvo a través de las siguientes etapas A, B, C, D y E.

EtapA A: Preparación de (2*S*,4*S*)-4-azidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo

5 (2*S*,4*R*)-4-((Metilsulfonil)oxi)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (48.5 g, 150 mmol) se disolvió en *N,N'*-dimetilformamida (250 ml) bajo nitrógeno, y se adicionó al mismo azida de sodio (19.5 g, 300 ml). Después de la agitación a 80°C durante 16 horas, el solvente de reacción
10 se concentró bajo presión reducida, se adicionó agua y la extracción se realizó dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con una solución de cloruro de sodio acuosa y agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró bajo presión reducida para obtener el
15 producto crudo (39.59 g, 98%), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

MS [M+H] = 271 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.43-4.37 (m, 1H), 4.35-4.27 (br, 1H), 3.77 (s, 1.8H), 3.76 (s, 1.2H), 3.73-3.66 (m, 1H),
20 3.44-3.38 (m, 1H), 2.63-2.49 (m, 1H), 2.19-2.11 (m, 1H), 1.50 (s, 4.5H), 1.44 (s, 4.5H)

EtapA B: Preparación de (2*S*,4*S*)-4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo

(2*S*,4*S*)-4-Azidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (24.59 g, 91.0 mmol) obtenido en la Etapa
25

A se disolvió en tetrahidrofurano (180 ml), y luego se adicionó al mismo lentamente solución de tetrahidro de trimetilfosfina (109.2 ml, 109.2 mmol) a 0°C. Después de la agitación a la misma temperatura durante una hora, la mezcla se agitó a
 5 temperatura ambiente durante tres horas. Después de que el solvente de reacción se concentró bajo presión reducida, se adicionaron diclorometano (100 ml) y agua (150 ml) y se agitaron durante aproximadamente 30 minutos. Después de que las capas se separaron y se extrajeron una vez más con
 10 diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo (20.62 g, 93%), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

MS [M+H] = 245 (M+1)

15 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.27 (m, 1H), 3.77 (s, 1.8H), 3.76 (s, 1.2H), 3.75-3.67 (m, 1H), 3.50-3.42 (m, 1H), 3.22-3.17 (m, 1H), 2.58-2.47 (m, 1H), 1.82-1.71 (m, 1H), 1.48 (s, 4.5H), 1.42 (s, 4.5H)

20 Etapas C: Preparación de (2S,4S)-4-(((1S,4R)-4-metilciclohexil)-amino)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(ter-butil) 2-metilo

(2S,4S)-4-Aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(ter-butil) 2-metilo (20.62 g, 84.4 mmol) obtenido en la Etapa B se disolvió en dicloroetano (150 ml), y se adicionó al mismo
 25 y 4-metilciclohexanona (9.5 ml, 101.3 mmol). Se adicionó

triacetoxiborohidruro de sodio (26.8 g, 126.6 mmol) a 0°C y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El solvente de reacción se concentró bajo presión reducida, se adicionó agua y la extracción se realizó dos veces con acetato de etilo. La
 5 capa orgánica se lavó con una solución de cloruro de sodio acuosa, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto del título (22.9 g, 80%).

10 MS [M+H] = 341 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.26 (m, 1H), 3.76 (s, 1.8H), 3.75 (s, 1.2H), 3.78-3.71 (m, 1H), 3.49-3.40 (m, 1H), 3.22-3.16 (m, 1H), 2.69-2.60 (br, 1H), 2.58-2.46 (m, 1H), 1.87-1.77 (m, 1H), 1.73-1.63 (m, 1H), 1.62-1.35 (m, 8H), 1.48 (s,
 15 4.5H), 1.42 (s, 4.5H), 0.96 (d, 3H)

Etapas D: Preparación de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)isobutiramido)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo

(2*S*,4*S*)-4-((1*S*,4*R*)-4-Metilciclohexil)amino)-
 20 pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (37.29 g, 109.5 mmol) obtenido en la Etapa C se disolvió en diclorometano (500 ml), se adicionó trietil amina (61.1 ml, 438.1 mmol), y se adicionó lentamente cloruro de isobutirilo (11.7 ml, 219 mmol) a 0°C. Después de la agitación a
 25 temperatura ambiente durante 16 horas, el solvente de reacción

se concentró bajo presión reducida, se adicionó una solución de hidrógeno carbonato de sodio acuoso, y la extracción se realizó dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con una solución de cloruro de sodio acuosa y agua, se secó sobre
 5 sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto del título (38.79 g, 86%).

MS [M+H] = 411 (M+1)

10 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.27 (m, 1H), 3.76 (s, 1.8H), 3.75 (s, 1.2H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.50-3.41 (m, 1H), 3.33-3.14 (m, 1H), 2.69-2.60 (m, 2H), 2.57-2.43 (m, 1H), 1.87-1.79 (m, 1H), 1.70-1.61 (m, 1H), 1.60-1.32 (m, 8H), 1.47 (s, 4.5H), 1.41 (s, 4.5H), 1.10 (dd, 6H), 0.99 (d, 3H)

15 Etapla E: Preparación de clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclo-hexil)isobutiramido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo

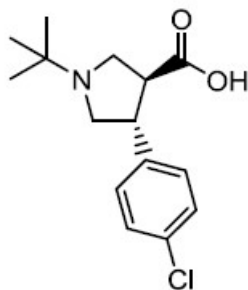
(2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-Metilciclohexil)isobutiramido)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (34.0 g, 82.8 mmol) obtenido en la Etapa D se disolvió en diclorometano (200 ml), y una solución de 1,4-dioxano de ácido clorhídrico 4N (82.8 ml, 331.3 mmol) se adicionó a 0°C. Después de la agitación a temperatura ambiente durante 6 horas, el solvente de reacción se concentró bajo presión reducida para
 20 obtener el producto crudo (28.7 g, 99%), que se utilizó en la

siguiente etapa sin purificación.

$$\text{MS}[\text{M}+\text{H}] = 311 \quad (\text{M}+1)$$

Ejemplo de Preparación 2: Preparación de ácido (3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carboxílico

5



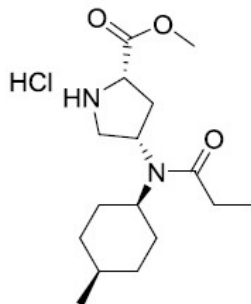
10 El compuesto del título se obtuvo por el método descrito en la Publicación Internacional No. WO 2004/092126.

$$\text{MS}[\text{M}+\text{H}] = 282 \quad (\text{M}+1)$$

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.43-7.33 (m, 4H),
 15 3.90-3.69 (m, 3H), 3.59 (dd, $J = 11.2, 10.0$ Hz, 1H),
 3.29 (dd, $J = 11.2, 11.2$ Hz, 1H), 3.18-3.09 (m, 1H), 1.44 (s, 9H)

Ejemplo de Preparación 3: Preparación de clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-(1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)-pirrolidin-2-carboxilato de metilo

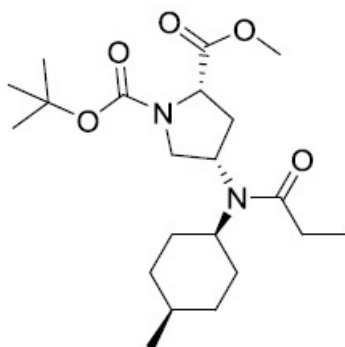
20



25

El compuesto del título se obtuvo a través de las Etapas A y B.

5 Etapa A: Preparación de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclo-hexil)propionamido)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo



10

El compuesto del título (0.98 g, 84%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa D en el Ejemplo de Preparación 1 al utilizar (2*S*,4*S*)-4-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)amino)-
 15 pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (1.0 g, 2.9 mmol) obtenido en la Etapa C del Ejemplo de Preparación 1 y cloruro de propionilo (0.33 g, 3.5 mmol).

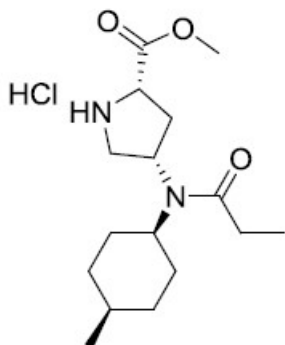
MS [M+Na] = 419.5 (M+23)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.33 (m, 1H), 4.00-3.80 (m, 2H), 3.75 (m, 3H), 3.58 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 2.85-2.68 (m, 1H), 2.38 (q, 2H), 2.31 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.80 (m, 2H), 1.72-1.55 (m, 4H), 1.45 (m, 2H), 1.45-1.41 (m, 9H), 1.07 (m, 6H)

25 Etapa B: Preparación de clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)pirrolidin-2-

carboxilato de metilo

5



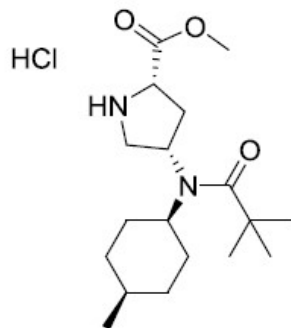
El compuesto del título (0.76 g, 93%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa E del Ejemplo de Preparación 1 al utilizar (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)-
 10 pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (0.98 g, 2.4 mmol) obtenido en la Etapa A.

MS [M+H] = 297.4 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.95 (brs, 1H), 8.63 (brs, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.53 (m, 1H),
 15 3.40 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), 2.37 (q, 2H), 2.24 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.68-1.55 (m, 4H), 1.52 (m, 2H), 1.40 (m, 2H), 0.97 (m, 6H)

Ejemplo de Preparación 4: Preparación de clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo

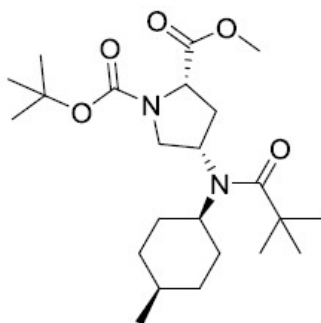
20



25

El compuesto del título se obtuvo a través de las Etapas A y B.

EtapA A: Preparación de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo

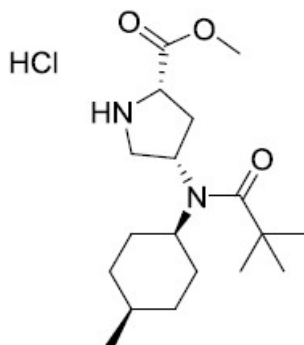


El compuesto del título se obtuvo en el método descrito en Publicación Internacional No. WO 2008/007930.

MS [M+Na] = 447.5 (M+23)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.34 (m, 1H), 3.90-3.75 (m, 2H), 3.73 (m, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.75-2.60 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.85 (m, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.50 (m, 2H), 1.45-1.41 (m, 9H), 1.25-1.20 (m, 9H), 1.05 (d, 3H)

EtapA B: Preparación de clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo

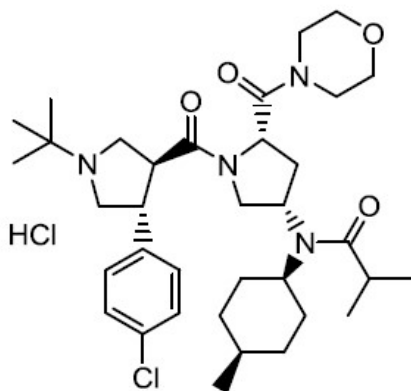


El compuesto del título (0.68 g, 99%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa E del Ejemplo de Preparación 1 al utilizar (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)-pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(*ter*-butil) 2-metilo (0.80 g, 1.88 mmol) obtenido en la Etapa A.

MS [M+H] = 325.4 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.24 (brs, 1H), 8.60 (brs, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.77 (m, 3H), 3.40-3.28 (m, 3H), 2.55 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.70-1.50 (m, 6H), 1.40 (m, 2H), 1.21-1.10 (m, 9H), 1.00 (m, 3H)

Ejemplo 1: Preparación de clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-ciclohexil)isobutiramida



El compuesto del título se obtuvo a través de las Etapas A, B, C y D.

Etapa A: Preparación de (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-

metilciclohexil)isobutiramido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo

Clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-ciclohexil)isobutiramido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo
 5 (28.7 g, 82.73 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 1, ácido (3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carboxílico (24.5 g, 86.87 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 2, clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (22.2 g, 115.83 mmol), e hidrato de 1-
 10 hidroxibenzotriazol (15.7 g, 115.83 mmol) se disolvieron en *N,N'*-dimetilformamida (400 ml), y se adicionó lentamente *N,N'*-diisopropiletilamina (72.0 ml, 413.66 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 16 horas, el solvente de reacción se concentró bajo presión reducida, luego se
 15 adicionó una solución de hidróxido de sodio acuoso 0.5 N, y la extracción se realizó dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó dos veces con una solución de cloruro de sodio acuosa y agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró
 20 bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto del título (41.19 g, 87%).

MS [M+H] = 575 (M+1)

Etapas B: Preparación de ácido (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-

((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)isobutiramido)pirrolidin-2-carboxílico

(2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-Butil)-4-(4-clorofenil)-pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-isobutiramido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo (39.4 g, 68.62 mmol) obtenido en la Etapa A se disolvió en metanol (450 ml), y se adicionó una solución de hidróxido de sodio acuoso 6N (57.2 ml, 343.09 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 16 horas y ajustar el pH a aproximadamente 5 con una solución de ácido clorhídrico acuoso 6N, la solución de reacción se concentró bajo presión reducida. El concentrado se disolvió en diclorometano, y luego el sólido insoluble se filtró con un filtro de papel. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el producto crudo (38.4 g, 99%), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

MS [M+H] = 561 (M+1)

Etapa C: Preparación de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-isobutiramida

Ácido (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-isobutiramido)pirrolidin-2-carboxílico (38.4 g, 68.60 mmol) obtenido en la Etapa B, se adicionaron lentamente y

secuencialmente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (18.4 g, 96.04 mmol), e hidrato de 1-hidroxi-benzotriazol (13.0 g, 96.04 mmol) en *N,N'*-dimetilformamida (200 ml), y morfolina (5.9 ml, 68.80 mmol) y se adicionaron
 5 lentamente y secuencialmente *N,N'*-diisopropiletilamina (59.7 ml, 343.02 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 16 horas, la solución de reacción se concentró bajo presión reducida, se adicionó una solución de hidróxido de sodio acuoso 0.5 N, y la extracción se realizó dos veces con
 10 acetato de etilo. La capa orgánica se lavó dos veces con una solución de cloruro de sodio acuosa y agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto del título
 15 (37.05 g, 86%).

MS [M+H] = 630 (M+1)

Etapa D: Preparación de clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metil-
 20 ciclohexil)isobutiramida

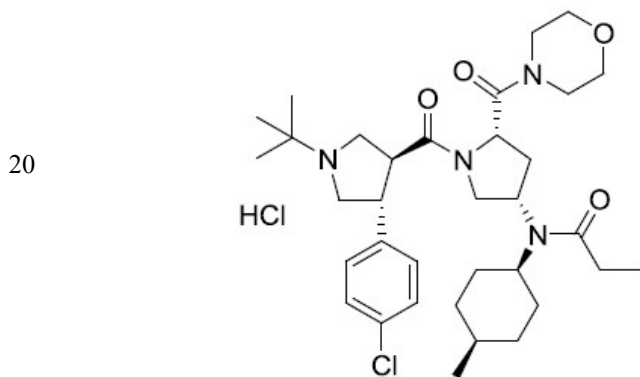
N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-Butil)-4-(4-clorofenil)-pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)isobutiramida (5.0 g, 7.95 mmol) obtenida en la Etapa C se disolvió en acetato de etilo (50 ml),
 25 y se adicionó lentamente una solución de acetato de etilo de

ácido clorhídrico 2N (3.97 ml, 15.89 mmol). Después de la
 agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, el
 solvente de reacción se concentró bajo presión reducida. El
 sólido crudo resultante se purificó mediante trituración
 5 utilizando hexano y éter dietílico para obtener el compuesto
 del título (5.23 g, 99%).

MS [M+H] = 630 (M+1)

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.49–7.44 (m, 4H),
 4.83 (m, 1H), 4.23–4.20 (m, 1H), 3.95–3.91 (m, 2H),
 10 3.79–3.47 (m, 14H), 3.03–3.00 (m, 1H), 2.86–2.82 (m, 1H),
 2.73–2.67 (m, 1H), 2.20–2.14 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.80–
 1.62 (m, 5H), 1.50 (s, 9H), 1.44–1.27 (m, 3H), 1.06–1.04
 (m, 9H)

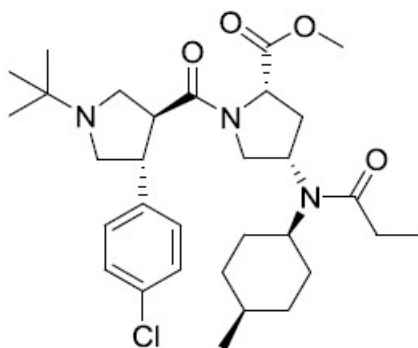
**Ejemplo 2: Preparación de clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-
 15 1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-
(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-(1*S*,4*R*)-4-metil-
ciclohexil)propionamida**



El compuesto del título se obtuvo a través de las
 25 Etapas A, B, C y D.

Etapa A: Preparación de (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo

5

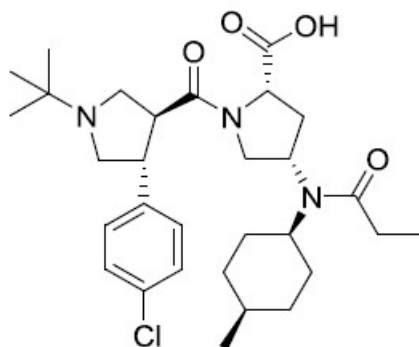


El compuesto del título (0.45 g, 35%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa A del Ejemplo 1 al utilizar clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-propionamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo (0.76 g, 2.28 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 3 y ácido (3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carboxílico (0.64 g, 2.28 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 2.

MS [M+H] = 560.4 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.39-7.30 (m, 4H), 4.45 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.65-3.35 (m, 6H), 3.13 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.71 (m, 1H), 2.34 (q, 2H), 2.20 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.75-1.55 (m, 6H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 9H), 1.03 (m, 6H)

Etapa B: Preparación de ácido (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)pirrolidin-2-carboxílico



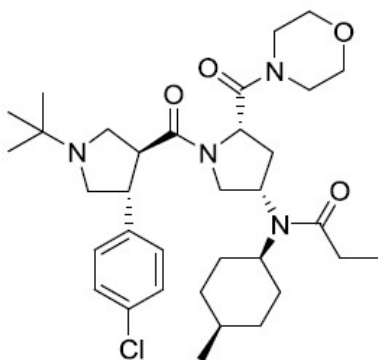
5

El compuesto del título (0.44 g, 99%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa B del Ejemplo 1 al utilizar (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)-pirrolidin-2-carboxilato de metilo (0.45 g, 0.80 mmol) obtenido en la Etapa A.

MS [M+H] = 546.4 (M+1)

Etapa C: Preparación de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-propionamida

20



25

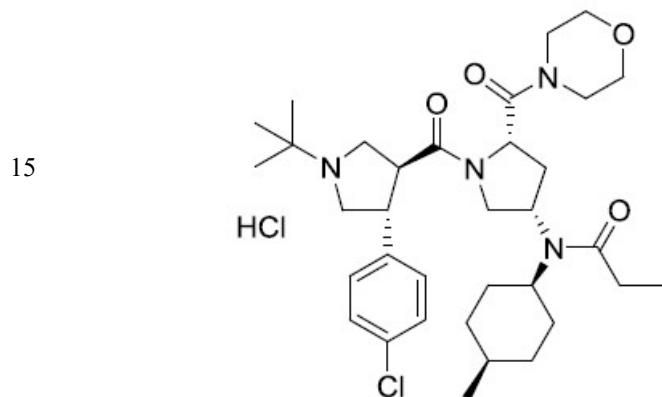
El compuesto del título (0.28 g, 53%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa C del Ejemplo 1 al utilizar ácido (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-

carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)propionamido)-
pirrolidin-2-carboxílico (0.44 g, 0.80 mmol) obtenido en la
Etapa B.

MS [M+H] = 615.5 (M+1)

5 ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.36 (m, 4H), 4.79 (m, 1H),
4.18 (m, 1H), 3.80-3.40 (m, 15H), 3.20 (m, 1H), 3.03 (m, 1H),
2.70 (m, 1H), 2.33 (q, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.71-
1.56 (m, 6H), 1.40-1.20 (m, 11H), 1.00 (m, 6H)

Etapa D: Preparación de clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-
10 ((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-
5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-
metilciclohexil)propionamida

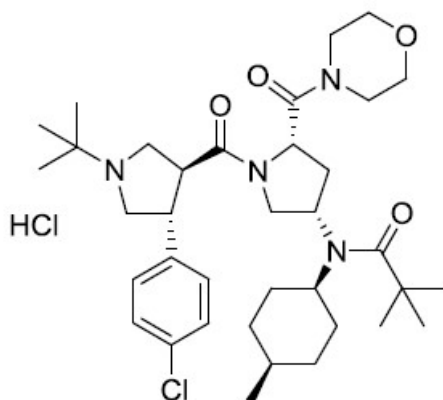


El compuesto del título (0.08 g, 94%) se obtuvo de la
20 misma manera como en la Etapa D del Ejemplo 1 al utilizar *N*-
((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-
carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-
metilciclohexil)propionamida (0.08 g, 0.13 mmol) obtenido en la
Etapa C.

25 MS [M+H] = 615.5 (M+1)

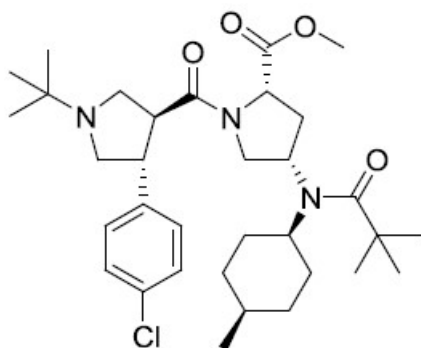
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.43 (m, 4H), 4.82 (t, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.06–3.40 (m, 15H), 2.97 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.33 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.80–1.53 (m, 5H), 1.47 (s, 9H), 1.50–1.25 (m, 4H), 1.01 (m, 6H)

Ejemplo 3: Preparación de clorhidrato de *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamida



El compuesto del título se obtuvo a través de la Etapa A, B, C y D.

Etapa A: Preparación de (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo



El compuesto del título (0.70 g, 66%) se obtuvo de la

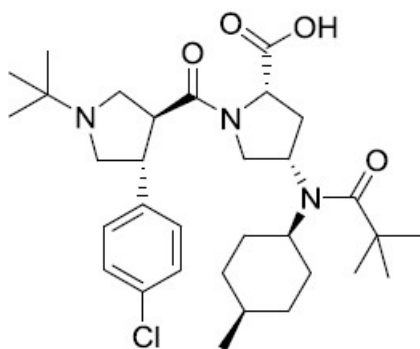
misma manera como en la Etapa A del Ejemplo 1 al utilizar clorhidrato de (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)-pivalamido)pirrolidin-2-carboxilato de metilo (0.65 g, 1.8 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 4 y ácido (3*S*,4*R*)-
 5 1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carboxílico (0.50 g, 1.8 mmol) obtenido en el Ejemplo de Preparación 2.

MS [M+H] = 588.5 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.30 (m, 4H), 4.49 (m, 1H), 4.00-3.50 (m, 4H), 3.71 (s, 3H), 3.40 (m, 3H), 3.20-3.05
 10 (m, 2H), 3.00 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.73-1.60 (m, 6H), 1.60-1.35 (m, 2H), 1.25-1.17 (m, 18H), 1.01 (m, 3H)

Etapa B: Preparación de ácido (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,
 15 4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)pirrolidin-2-carboxílico

20

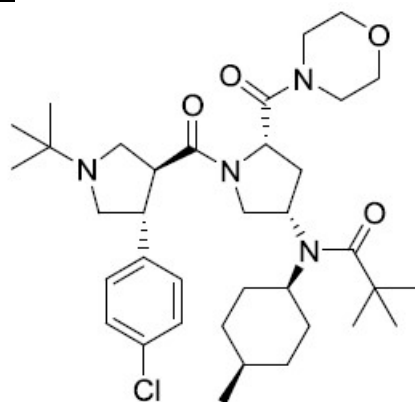


El compuesto del título (0.10 g, 99%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa B del Ejemplo 1 al utilizar (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*ter*-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metilciclohexil)pivalamido)-
 25

pirrolidin-2-carboxilato de metilo (0.10 g, 0.18 mmol) obtenido en la Etapa A.

MS [M+H] = 574.4 (M+1)

Etapa C: Preparación de N-((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butyl)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1s,4R)-4-metilciclohexil)-pivalamida



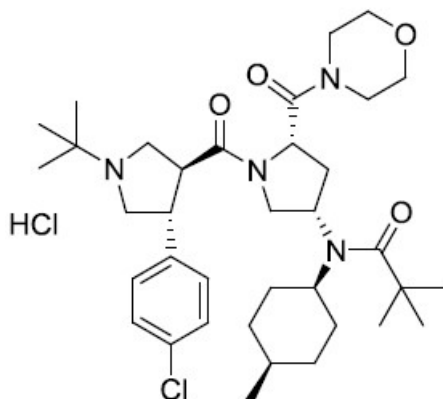
El compuesto del título (0.020 g, 17%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa C del Ejemplo 1 al utilizar ácido (2S,4S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butyl)-4-(4-clorofenil)-pirrolidin-3-carbonil)-4-(N-((1s,4R)-4-metilciclohexil)-pivalamido)pirrolidin-2-carboxílico (0.10 g, 0.18 mmol) obtenido en la Etapa B.

MS [M+H] = 643.5 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.40–7.30 (m, 4H), 4.79 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.80–3.40 (m, 15H), 3.10 (m, 1H), 2.96 (m, 1H), 2.71 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.80–1.35 (m, 8H), 1.21–1.15 (m, 18H), 1.02 (m, 3H)

Etapa D: Preparación de clorhidrato de N-((3S,5S)-1-

((3S,4R)-1-(ter-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-
5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-((1s,4R)-4-
metilciclohexil)pivalamida

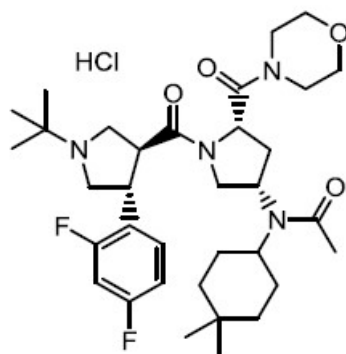


El compuesto del título (0.29 g, 83%) se obtuvo de la misma manera como en la Etapa D del Ejemplo 1 al utilizar *N*-((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-((1s,4R)-4-metilciclohexil)pivalamida (0.33 g, 0.51 mmol) obtenida en la Etapa C.

MS [M+H] = 643.5 (M+1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.41 (m, 4H), 4.80 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.80-3.40 (m, 13H), 2.94 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.15 (s, 9H), 1.45-1.30 (m, 3H), 1.01 (m, 3H)

Ejemplo Comparativo 1: Preparación de clorhidrato de *N*-((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butil)-4-(2,4-difluorofenil)-pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-*N*-(4,4-dimetilciclohexil)acetamida (A95)

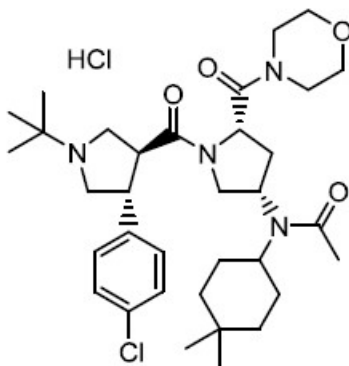


5

El compuesto A95 de la Publicación Internacional No. WO 2008/007930 se obtuvo por el mismo método como es descrito en la misma

Ejemplo Comparativo 2: Preparación de clorhidrato de N-((3S,5S)-1-((3S,4R)-1-(ter-butil)-4-(4-clorofenil)pirrolidin-3-carbonil)-5-(morfolin-4-carbonil)pirrolidin-3-il)-N-(4,4-dimetilciclohexil)acetamida (A96)

15



El compuesto A96 de la Publicación Internacional No. WO 2008/007930 se obtuvo por el mismo método como es descrito en la misma

Ejemplo Experimental 1: Ensayo de Luciferasa

Para medir la habilidad agonista contra MC4R (receptor de melanocortina-4), se estableció una línea celular que expresa permanentemente el gen luciferasa (CRE-LUC) bajo el

25

control de MC4R y CRE (elemento de respuesta de cAMP). Después se preparó un vector de expresión de célula de mamífero (pCDNA3 (Neo)) (Invitrogen) que contiene el gen MC4R, las líneas celulares de riñón embriónico humano (HEK) se transformaron al utilizar Lipofectamine 2000 (Invitrogen) junto con un vector (pCRE-Luc) (Stratagen) que expresa un gen luciferasa (CRE-LUC) bajo el control de un elemento de respuesta de cAMP (CRE). Las líneas celulares transformadas (HEK MC4R-Luc) se incubaron en una incubadora a 37°C en la presencia de CO₂ al 5% durante 24 horas al utilizar el Medio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene Suero Bovino Fetal Inactivado con Calor al 10% (GIBCO/BRL). Las líneas celulares se incubaron durante cuatro días en la presencia de Medio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 10 ml de medio de selección (Suero Bovino Fetal Inactivado con Calor al 10% (GIBCO/BRL), 100 unidades/ml de penicilina (GIBCO/BRL), 100 unidades/ml de estreptomicina (GIBCO/BRL), 800 µg/ml de Geneticina (G418) (GIBCO/BRL). El proceso para remover las células exterminadas por el medio de selección al reemplazar el medio con 10 ml de un nuevo medio de selección se repitió tres veces, una vez cada 4 días. Las colonias individuales formadas por los clones finalmente seleccionados y propagados se transfirieron bajo un microscopio a una placa de cultivo celular de 24 cavidades que contiene 1 ml de medio de selección por cavidad y se incubaron durante 4 días. Forskolin (SIGMA) se trató a una concentración final de

10 μM , y luego se incubó durante cinco horas en una incubadora a 37°C en la presencia de CO_2 al 5%. Cada cavidad se trató con 50 μl de un reactivo de luciferasa Bright-Glo (Promega) y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego la
5 luminiscencia de cada cavidad se midió al utilizar un luminómetro (Victor). Los clones que exhiben luminiscencia de 100 veces o más del valor básico mediante el tratamiento con Forskolin se seleccionaron y se utilizaron para medir la habilidad del agonista MC4R de cada compuesto.

10 Las células HEK MC4R-Luc se adicionaron a cada cavidad de una placa de cultivo celular de luminómetro de 96 cavidades (Costar) a un tamaño de 2.5×10^4 células en 100 μl de un medio de cultivo y luego se incubaron en una incubadora a 37°C en la presencia de CO_2 al 6% durante 18 horas. El agonista
15 MCR diluido en cada concentración de la etapa al utilizar el medio de cultivo anterior se trató de modo que la concentración de DMSO final no excedió 1%, y luego se incubó durante cinco horas en una incubadora a 37°C en la presencia de CO_2 al 6%. Cada cavidad se trató con 50 μl de un reactivo de luciferasa
20 Bright-Glo (Promega) y se dejó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y luego la luminiscencia de cada cavidad se midió al utilizar un luminómetro (Victor). La cantidad de luminiscencia inducida por el agonista diluido en cada concentración de la etapa se convirtió en un % de valor
25 relativo con respecto a la cantidad exhibida por un tratamiento

de NDP- α -MSH 10 μ M. EC_{0.5} MSH se expresa como una concentración que induce 50% de la cantidad máxima de luminiscencia que se puede inducir por NDP- α -MSH, y EC₅₀ se expresa como una concentración que induce 50% de la cantidad máxima de luminiscencia que se puede inducir por cada agonista. Las mediciones se midieron utilizando el software estadístico (Prizm).

La Tabla 1 muestra los resultados para medir la habilidad agonista de MC4R de cada compuesto obtenido por los experimentos anteriores en las unidades EC₅₀ (nM).

[Tabla 1]

Ensayo de luciferasa, EC50 (nM)	
Compuesto	MC4R
Ejemplo 1	0.562
Ejemplo 2	1.073
Ejemplo 3	0.675
Ejemplo Comparativo 1 (A95)	17.45
Ejemplo Comparativo 2 (A96)	5.479

Como se muestra en la Tabla 1, se confirmó que, entre los receptores de melanocortina bien conocidos in vivo, con respecto al receptor de melanocortina-4 (MC4R) involucrado en el metabolismo de energía y control de peso in vivo, los compuestos de los ejemplos tienen más excelente actividad agonista MC4R que los compuestos de los ejemplos comparativos

(A95 y A96).

Ejemplo Experimental 2: Ensayo de cAMP

El receptor de melanocortina es un tipo de receptor acoplado a la proteína G (GPCR), y la función principal de la proteína G es activar los transductores secundarios para regular las respuestas celulares a muchos estímulos fisiológicos a través de la transducción de señal. MC4R es un receptor acoplado a Gs, y se conoce que si MC4R interactúa con un agonista, se activa adenilato ciclasa (AC) para incrementar la concentración de AMP cíclico (cAMP), que es uno de los transductores secundarios en las células. Por lo tanto, es posible evaluar la actividad de los receptores de melanocortina al medir la generación de señales de cAMP.

Después de que se establecieron las líneas celulares acopladas a Gs Hunter cAMP (línea celular CHO-K1) en las cuales cada uno de MC1R, MC3R, MC4R y MC5R se sobre-expresó de modo que el incremento en el nivel de cAMP en las células debido a la reacción agonista fue medible, las células se inocularon en cada cavidad de una placa de cultivo celular blanca y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37°C en la presencia de CO₂ al 5%. Después de la incubación, el medio se removió, y 15 µl de un reactivo 2:1 de HBBS/HEPES 10mM:cAMP XS+Ab se adicionó. Después 5 µl de la muestra diluida 4 veces con amortiguador se adicionó, la concentración del vehículo se estableció a 1%, y el compuesto agonista MC4R diluido en cada

concentración de la etapa se adicionó, seguido por la reacción a 37°C durante 30 minutos. La actividad (%) de cada compuesto agonista se expresa como $100\% \times (\text{valor RLU promedio de muestra} - \text{valor RLU promedio de control de vehículo}) / (\text{valor RLU promedio de control max} - \text{valor RLU promedio de control de vehículo})$, y el valor se analizó mediante el sitio de análisis de datos CBIS (ChemInnovation, CA).

La Tabla 2 muestra los resultados de medir la habilidad agonista de los receptores de melanocortina de los compuestos obtenidos por los experimentos anteriores en las unidades EC_{50} (nM).

[Tabla 2]

Ensayo cAMP, EC_{50} (nM)	
Compuesto	MC4R
Ejemplo 1	36.5
Ejemplo 2	50.3
Ejemplo 3	22.7
Ejemplo Comparativo 1 (A95)	335.3
Ejemplo Comparativo 2 (A96)	150.0

Como se muestra en la Tabla 2, se confirmó que, entre los receptores de melanocortina bien conocidos in vivo, con respecto al receptor de melanocortina-4 (MC4R) involucrado en el metabolismo de energía y control de peso in vivo, los compuestos de los ejemplos tienen más excelente habilidad

agonista del receptor que los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96).

Ejemplo Experimental 3: Ensayo de β -arrestina

El receptor de melanocortina es un tipo de receptor
5 acoplado a la proteína G (GPCR) y regula varias respuestas fisiológicas al transducir señales de muchos neurotransmisores. Cuando GPCR es fosforilado, la β -arrestina se enlaza a la parte fosforilada del receptor y desempeña una función importante en activar varias rutas de señalización en las células a través de
10 la interacción con otras proteínas. Se conoce que, cuando el receptor de melanocortina interactúa con un agonista, la β -arrestina se moviliza y se involucra en la ruta de señalización mediada por β -arrestina. Por lo tanto, la actividad del receptor de melanocortina se puede evaluar a través de la
15 medición de β -arrestina.

Se estableció una línea celular de β -arrestina Pathhunter eXpress (línea celular U2OS) en la cual MC1R, MC3R, MC4R, MC5R etiquetados con ProLink (PK) y β -arrestina etiquetada con aceptor de Enzima (EA) se expresaron
20 conjuntamente. Cuando la porción MCR-PK de esta línea celular se activa, β -arrestina-EA se moviliza, y el aceptor de enzima (EA) y ProLink (PK), que son los fragmentos de enzima β -galactosidasa, interactúan. La enzima activada hidroliza el sustrato mediante la actividad de β -galactosidasa para
25 producir una señal quimioluminiscente, de modo que la actividad

se puede medir. Después de que se incubó la línea celular de β -arrestina Pathhunter eXpress (línea celular U2OS), las células se inocularon en cada cavidad de la placa de cultivo celular y se incubaron durante 48 horas en una incubadora a 37°C en la presencia de CO₂ al 5%. Después de la incubación, 5 μ l de la muestra diluida 5 veces con amortiguador se adicionó, la concentración de vehículo se estableció a 1%, y el compuesto agonista MC4R diluido en cada concentración de la etapa se adicionó, seguido por la reacción a 37°C durante 90 minutos. La actividad (%) de cada compuesto agonista se expresa como $100\% \times (\text{valor RLU promedio de muestra} - \text{valor RLU promedio de control de vehículo}) / (\text{valor máximo promedio de ligando de control} - \text{valor RLU promedio de control de vehículo})$, y el valor se analizó mediante el sitio de análisis de datos CBIS (ChemInnovation, CA).

La Tabla 3 muestra los resultados de medir la habilidad de la actividad del receptor de melanocortina de cada compuesto obtenido por los experimentos anteriores en las unidades EC₅₀ (nM).

[Tabla 3]

Ensayo de β -arrestina, EC ₅₀ (nM)	
Compuesto	MC4R
Ejemplo 1	4.6
Ejemplo 2	8.7

Ejemplo 3	3.3
Ejemplo Comparativo 1 (A95)	176.4
Ejemplo Comparativo 2 (A96)	44.3

Como se muestra en la Tabla 3, se confirmó que, entre los receptores de melanocortina bien conocidos in vivo, con respecto al receptor de melanocortina-4 (MC4R) involucrado en el metabolismo de energía y control de peso in vivo, los compuestos de los ejemplos tienen más excelente habilidad agonista del receptor que los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96).

Ejemplo Experimental 4: Afinidad de Enlace

Cinco subtipos de receptor de melanocortina (MCR) in vivo son conocidos, y se conoce que MC4R, que es el Subtipo 4, está involucrado en el metabolismo de energía y control de peso. Puesto que otros subtipos MCR están involucrados en la regulación de varias funciones in vivo tales como pigmentación de la piel, homeostasis de energía y funciones exocrinas, asegurando la selectividad para MC4R de los compuestos agonistas MC4R es muy importante en prevenir posibles efectos secundarios en el futuro. Por lo tanto, las habilidades de enlace de receptor de los agonistas MC4R para cada subtipo MCR se midieron.

Después de que se establecieron la línea celular CHO-K1 que expresa MC1R recombinante humano y las líneas celulares

HEK-293 que expresan MC3R, MC4R y MC5R, las membranas se recolectaron de cada línea celular. En una placa de cultivo celular de 96 cavidades, 3 μg de membrana MC1R y ^{125}I -NDP- α -MSH 0.04 nM por cavidad se hicieron reaccionar a 37°C durante dos horas. 3 μg de membrana MC3R y MC5R y ^{125}I -NDP- α -MSH 0.035 nM se hicieron reaccionar a 37°C durante una hora, y 3.12 μg de membrana MC4R y ^{125}I -NDP- α -MSH 0.02 nM se hicieron reaccionar a 37°C durante dos horas. En este tiempo, amortiguador de adsorción HEPES-KOH 25 mM (pH 7.0) que contiene agonista MCR diluido en cada concentración de la etapa se adicionó a cada cavidad y se hizo reaccionar. La solución reaccionada se transfirió a un filtro y se lavó con un amortiguador de adsorción, y luego se midió la radioactividad. El valor que excluye la cantidad de enlace no específica en la presencia de 1 μM (MC1R) y 3 μM (MC3R, MC4R, MC5R) de NDP- α -MSH de cada cantidad de enlace total se utilizó como cantidades de enlace específicas de ^{125}I -NDP- α -MSH. Se midió el grado al cual el enlace específico de ^{125}I -NDP- α -MSH se inhibió por el agonista diluido en cada concentración de la etapa. IC50 se expresó como la concentración de cada agonista que inhibió el enlace específico de 50% de ^{125}I -NDP- α -MSH.

La Tabla 4 muestra los resultados para medir el enlace de los receptores de melanocortina de los compuestos obtenidos por el experimento anterior en las unidades K_i (nM).

[Tabla 4]

Afinidad de enlace, K_i (nM)	
Compuesto	MC4R
Ejemplo 1	65
Ejemplo 2	110
Ejemplo 3	24
Ejemplo Comparativo 1 (A95)	1400
Ejemplo Comparativo 2 (A96)	360

Como se muestra en la Tabla 4, se confirmó que, entre los receptores de melanocortina bien conocidos in vivo, con respecto al receptor de melanocortina-4 (MC4R) involucrado en el metabolismo de energía y control de peso in vivo, los compuestos de los ejemplos tienen más excelente habilidad de enlace de receptor que los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96).

Ejemplo Experimental 5: Farmacocinética y metabolismo de fármaco

Ejemplo Experimental 5-1: Perfil farmacocinético

Para investigar las propiedades farmacocinéticas (PK) del compuesto del Ejemplo 1 y los compuestos de los ejemplos comparativos, se realizó el siguiente experimento.

Para realizar la prueba PK para el compuesto del Ejemplo 1 y los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96), se prepararon ratones C57BL6 de aproximadamente 7 semanas de edad, 12 individuos se asignaron por sustancia administrada,

separados en grupos, y hambrientos para administración oral. En el día de la administración, una solución de fármaco se preparó a una concentración de 1 mg/mL al utilizar agua destilada (DW) como un vehículo y se administró oralmente a 1 mL por kg de peso corporal de cada individuo, y la dosis final fue 10 mg/kg. En 1, 3, 8 y 24 horas después de la administración, se recolectó sangre entera a través de la recolección de sangre cardiaca de cada uno de los 3 individuos en cada grupo y luego se colocó en un tubo de heparina para prevenir la coagulación. Después, el cerebro de cada individuo se recolectó y se colocó en un tubo EP, el peso del tejido se midió, y el almacenamiento congelado se realizó a -20°C.

En el día del análisis, DDW de 4 veces el volumen del peso de tejido se adicionó a cada tubo de tejido y se homogenizó, y el plasma almacenado se descongeló a temperatura ambiente. Como con el plasma, 50 µL de homogenado de tejido se tomó y se transfirió a un tubo separado, y luego 200 µL de acetonitrilo (AN), que es 4 veces el volumen de la muestra en total, se adicionó a cada tubo del plasma y homogenado de tejido para realizar la desproteínización. En este caso, AN incluyó un estándar interno. Para preparar una curva de calibración, una solución de AN (con Estándar Interno) con concentraciones conocidas de 0.1, 0.5, 5, 50 y 500 ng/mL se preparó, y la desproteínización se realizó con un volumen de 4 veces como en lo anterior en plasma objetivo de cada uno del

plasma y el cerebro. De esta manera, las curvas de calibración final de 0.4 a 2,000 ng/mL para el plasma y 1, 5, 50, 500, y 5,000 ng/mL para el cerebro se prepararon. Después de que 0.5 μ L del sobrenadante obtenido después de la desproteínización se
 5 inyectó en LC-MS/MS, las áreas pico de los compuestos del ejemplo y los ejemplos comparativos (A95 y A96) se corrigieron con las áreas pico de IS para obtener la respuesta pico en cada punto de recolección de muestra y realizar la conversión de la concentración por una curva de calibración.

10 Los parámetros farmacocinéticos (C_{max} , AUC_{inf} , $t_{1/2}$, y los similares) se calcularon por un método de análisis no compartimental al utilizar WinNonlin 8.1 para los valores de la concentración en sangre con el tiempo para cada grupo de administración.

15 Las características farmacocinéticas de cada compuesto se compararon al comparar la exposición, cambios de vida media, y los similares para cada grupo de administración de fármaco, y los valores resultantes se muestran en las Tablas 5 y 6. Además, los valores de resultado de acuerdo con la
 20 relación de la exposición al cerebro a la exposición de sangre se muestran en la Tabla 7.

[Tabla 5]

Parámetros	Plasma		
	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo	Ejemplo

		1 (A95)	Comparativo 2 (A96)
$C_{\max}$ (ng/ml)	232.3	205.0	337.1
$AUC_{\inf}$ (ng · hr/mL)	2067.0	564.6	1654.5
$t_{1/2}$ (hr)	3.9	2.7	2.6

[Tabla 6]

Parámetros	Cerebro		
	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo 1 (A95)	Ejemplo Comparativo 2 (A96)
$C_{\max}$ (ng/ml)	49.1	20	27.1
$AUC_{\inf}$ (ng · hr/mL)	1495.3	222.1	529.6
$t_{1/2}$ (hr)	19.0	6.0	8.0

[Tabla 7]

Relación AUC de Cerebro a Plasma			
Parámetros	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo 1 (A95)	Ejemplo Comparativo 2 (A96)
	Relación media		
Valor	0.72	0.39	0.32

A partir de los resultados anteriores, la exposición de cada compuesto se confirmó en el cuerpo completo y en el

cerebro en el orden del compuesto del Ejemplo 1, el compuesto del Ejemplo Comparativo 2 (A96) y el compuesto del Ejemplo Comparativo 1 (A95). La vida media de pérdida en el cerebro durante el período de observación es más alta que el valor observado en la sangre, y se asume que esto significa persistencia efectiva de una serie de sustancias en el sitio de expresión de eficacia. Además, se confirmó que, cuando cada compuesto se administró por la misma dosis, el compuesto del ejemplo tuvo la exposición absoluta mucho más excelente y persistencia en el cerebro. Además, se confirmó que la relación de la exposición del cerebro a la exposición de la sangre del compuesto del Ejemplo 1 también fue la más excelente comparado con los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96).

Además de estos resultados, cuando la actividad *in vitro* de cada compuesto y la persistencia del fármaco se consideraron comprensivamente, la mejor eficacia fue capaz de ser esperada del compuesto del Ejemplo 1 en comparación con los compuestos de los ejemplos comparativos, cuando la misma dosis se administró. Para lograr la eficacia de un nivel específico, una dosis más baja se puede administrar, y por consiguiente, se espera minimizar los efectos secundarios que resultan de la exposición sistémica.

Ejemplo Experimental 5-2: Inhibición de CYP (%)

Para confirmar la interacción del fármaco contra la isozima CYP (citocromo P450), el siguiente experimento se

realizó.

Para medir y comparar la habilidad inhibidora del compuesto del Ejemplo 1 y el compuesto del Ejemplo Comparativo 2 (A96), se prepararon las enzimas recombinantes CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4. La siguiente Tabla 8 se refirió para el uso de un sustrato de sonda, control positivo, e isozima y condiciones de medición con respecto a la medición de la habilidad inhibidora de cada sustancia.

[Tabla 8]

Isozima CYP	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Substrato de sonda	ER	FCA	BMC	MMC	7BQ
(concentraciones finales)	0.5 μ M en acetonitrilo al 1%	50 μ M en acetonitrilo al 1%	10 μ M en DMSO al 1%	10 μ M en metanol al 1%	25 μ M en acetonitrilo al 1%
Control positivo	Furafilina	Ácido tienílico	Ticlopi- dina	Paroxe- tina	Troleando- micina
Concentración final positiva (mg/mL)	0.01	0.1	0.0014	0.008	0.1
Longitud de onda (nm) :excitación	530/590	409/508	409/460	409/485	409/530

/emisión					
----------	--	--	--	--	--

La incubación se realizó en una placa de 96 cavidades (Costar, 3792-negro, fondo redondo), el sistema amortiguador utilizado para el metabolismo fue amortiguador de fosfato de potasio 50 mM y pH 7.4, y el volumen de reacción final fue 250

5 μ L. Las concentraciones finales del compuesto del Ejemplo 1, el compuesto del Ejemplo Comparativo 2 (A96), y el control positivo en el amortiguador total fue 10 μ M (metanol al 2% (v/v)), y cada uno incluyó control negativo (metanol únicamente, 2% (v/v)). El amortiguador enriquecido con el

10 compuesto experimental se mezcló con el mismo volumen de solución prep de isozima CYP de modo que la concentración final fue 10 μ M, seguido por pre-calentamiento durante 10 minutos en un lector de placa de fluorescencia a 37°C. Cada solución NRS en la cavidad (Sistema de Regeneración NADPH: β -NADP 0.22 mM,

15 glucosa-6-fosfato 2.8 mM y 0.6 unidades/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) se adicionó, seguido por la pre-incubación durante 30 minutos. Después, la reacción se inició al adicionar el sustrato a la cavidad sometida a la pre-incubación y se monitoreó en intervalos de un minuto en la longitud de onda de

20 medición para cada sustrato durante 30 minutos. Los valores medidos obtenidos del control positivo y el compuesto del Ejemplo 1 se compararon con la intensidad de fluorescencia de un control negativo (sin inhibición o compuesto) para confirmar

la habilidad inhibidora de cada compuesto contra la isozima. La habilidad inhibidora (%) contra cada isozima cuando cada compuesto se trató a 10 μ M se muestra en la Tabla 9. La actividad inhibidora (%) se expresó en base a los siguientes

5 criterios: A =< 50%, B => 50%.

La concentración de tratamiento de 10 μ M del compuesto fue muy alta, y es un criterio conservador para evaluar la habilidad inhibidora en base a tal concentración de tratamiento y seleccionar un fármaco con una tasa inhibidora

10 menor que 50% como un candidato. Se puede considerar que es menos probable que el fármaco candidato seleccionado en este caso inhiba la isozima CYP.

[Tabla 9]

	Inhibición de CYP (%) a 10 μ M				
Isozima CYP	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Ejemplo 1	A	A	A	A	A
Ejemplo Comparativo 2 (A96)	A	B	A	A	A

A partir de los resultados anteriores, cuando se

15 trató en la misma concentración, se confirmó que la habilidad inhibidora del compuesto del Ejemplo 1 contra la isozima CYP principal fue menor que o similar a aquella del compuesto (A96) del Ejemplo Comparativo 2. Hay una preocupación de que el Compuesto (A96) del Ejemplo Comparativo 2 tuvo interacción de

fármaco debido a la habilidad inhibidora muy alta contra CYP2C9. CYP2C9 se conoce que está involucrada en el metabolismo de aproximadamente 10% de todos los fármacos comercialmente disponibles y exhibe una función principal en la pérdida de
5 eficacia de los fármacos con una ventana terapéutica más estrecha. Además, CYP2C9 es altamente significativo en tanto la investigación como en aspectos clínicos ya que se ha reportado polimorfismo dependiendo de cada individuo. Esto también se puede conocer del hecho de que CYP2C9 se presenta en la lista
10 de isozimas esenciales de las cuales el efecto inhibidor debe ser verificado durante el desarrollo del fármaco en la guía de interacción de fármaco-fármaco (DDI) de la FDA.

En base a esto, se determina que cuando el compuesto del Ejemplo 1 se administra, la interacción de fármaco causada
15 por la inhibición de CYP es menor que aquella del compuesto comparativo (A96).

Ejemplo Experimental 6: Farmacología

El efecto farmacológico del agonista de receptor de melanocortina-4 del compuesto de la presente invención se
20 evaluó en el siguiente modelo de obesidad.

Ejemplo Experimental 6-1: Modelo de obesidad de ratón inducido por dieta alta en grasa

El efecto de los agonistas del receptor de melanocortina-4 en la obesidad se evaluó al utilizar el modelo
25 de obesidad de ratón inducido con una dieta alta en grasa.

Los ratones C57BL/6N tónicos machos de cinco semanas de edad se alimentaron con una dieta en grasa de 60 kcal% (D12492, Dieta de Investigación) durante 15 semanas para inducir obesidad. El compuesto del Ejemplo 1, los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96), y sibutramina como un control positivo se prepararon en agua destilada y se administraron oralmente a modelos de obesidad de ratón de 19 semanas de edad inducida por una dieta alta grasa una vez al día desde el día 1 al día 16. Del Día 1 al Día 16, el peso corporal se midió una vez al día, la ingesta dietética se midió cinco veces a la semana, y la ingesta de agua para beber se midió dos veces a la semana. La glucosa en sangre y hemoglobina glicada se midieron en el Día 15, y todos los animales se sacrificaron en el Día 17. La sangre se recolectó a través de la vena cava abdominal, y el hígado y los tejidos adiposos epididimarios se removieron y se pesaron. La sangre recolectada se colocó en un tubo de heparina y se centrifugó para separar el plasma y luego se realizó el análisis bioquímico de plasma.

La Tabla 10 muestra la diferencia en la tasa de cambio de peso al vehículo medido en el Día 12 para cada dosis de cada compuesto.

[Tabla 10]

Día 12	10 mg/kg	30 mg/kg
Ejemplo 1	-9.4%*	-15.1%**

Ejemplo Comparativo 1	-4.8%	-4.0%
Ejemplo Comparativo 2	-0.2%	-7.1%
Sibutramina	-6.8%	NT (no probado)

5 (Diferencia en la tasa de cambio de peso al vehículo)

Diferencia significativa de peso corporal entre el grupo de control de vehículo y el grupo tratado con el compuesto: *p < 0.05, **p < 0.01 (Promedio ± SEM, Prueba t del Estudiante, no emparejada, dos colas)

10 En estos modelos de obesidad de ratón, particularmente, cuando solamente se administró el compuesto del Ejemplo 1, se mostró la pérdida de peso significativa. Cuando el compuesto del Ejemplo 1 se administró en dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg, se ocasionó -9.4% y -15.1% de inhibición de
 15 ganancia de peso comparado con el control de vehículo administrado de solvente, respectivamente, y se exhibió efecto de pérdida de peso estadísticamente significativa comparado con los compuestos de los ejemplos comparativos (A95 y A96).

Esto es causado por la habilidad superior del
 20 agonista MC4R in vitro, exposición absoluta de cerebro superior y persistencia, y excelente relación de exposición de cerebro comparada con la exposición de sangre del compuesto del Ejemplo 1, comparado con los compuestos de los ejemplos comparativos, y se considera que una diferencia significativa se puede
 25 exhibir aun en bajas dosis.

Además, el compuesto del Ejemplo 1 exhibió resultados superiores iguales a o más altos en términos de eficacia comparado con Sibutramina (Reductil), que es un agente de tratamiento de obesidad en la técnica relacionada, y de esta
5 manera se espera que exhiba eficacia de fármaco significativa en la aplicación clínica actual.