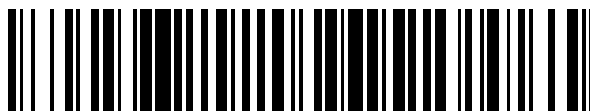


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 440**

51 Int. Cl.:

C07H 15/26 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008** **E 08853345 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013** **EP 2247602**

54 Título: **Derivados de adamantil O-glucurónido como inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV para el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

30.11.2007 US 4846 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.08.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

HASSIEPEN, ULRICH y
KITTELMANN, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

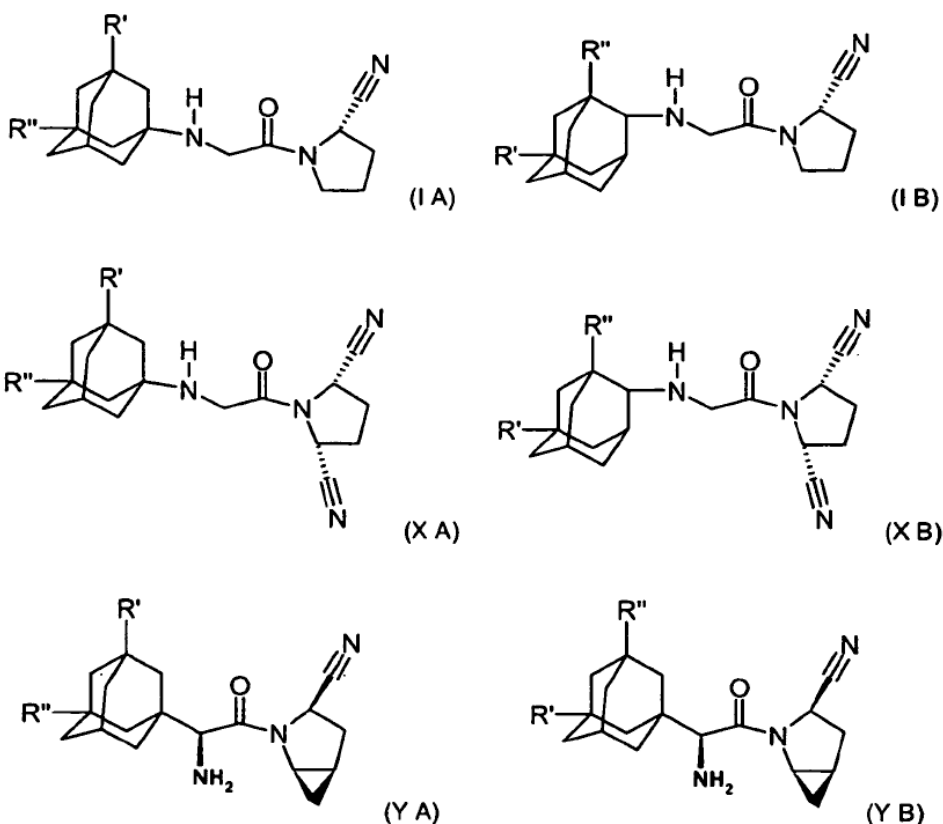
ES 2 418 440 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

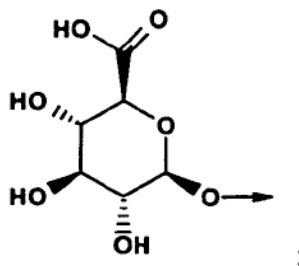
DESCRIPCIÓN

Derivados de adamantil O-glucurónico como inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV para el tratamiento de la diabetes.

- 5 La presente invención proporciona nuevos inhibidores de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) que son efectivos en el tratamiento de condiciones mediadas por DPP-IV. Se descubrió que la DPP-IV es responsable por la inactivación del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1). Ya que el GLP-1 es un estimulador importante de la secreción de la insulina pancreática y tiene efectos benéficos directos sobre la disposición de la glucosa, la inhibición de la DPP-IV parece representar un enfoque atractivo para tratar condiciones tales como la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM).
- 10 La presente invención se refiere a un compuesto de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B) (compuestos de la invención).



en donde R' representa



- 15 y R'' representa hidrógeno, hidroxi, alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono, alcanoilcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, o R₅R₄N-CO-O-, en donde R₄ y R₅ son independientemente alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o fenilo que está sustituido o no sustituido por un sustituyente seleccionado de entre alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono, halógeno y trifluorometilo y en donde R₄ adicionalmente es hidrógeno; o R₄ y R₅ juntos representan alquileno de 3 a 6 átomos de carbono;

en forma libre o en forma de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se relaciona con un compuestos de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B) como se describió aquí anteriormente, en donde R" representa hidrógeno.

5 En una forma de realización preferida, los compuestos de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B) como se describió aquí anteriormente están en una forma substancialmente pura.

10 Los compuestos de la presente invención pueden existir en forma libre o en la forma de una sal de adición ácida. Se prefieren sales farmacéuticamente aceptables (es decir, fisiológicamente aceptables, no tóxicas) aunque otras sales también son útiles, por ejemplo, en el aislamiento o la purificación de los compuestos de esta invención. Aunque las sales de adición ácida preferidas son los clorhidratos, también se pueden utilizar sales de ácido metanosulfónico, sulfúrico, fosfórico, cítrico, láctico y acético.

Los compuestos de la invención pueden existir en la forma de isómeros o diaestereoisómeros ópticamente activos y se pueden separar y recuperar por medio de técnicas convencionales, tales como cromatografía.

15 A continuación se enlistan las definiciones de diferentes términos utilizados para describir la esta invención. Estas definiciones aplican a los términos tal como se utilizan a través de esta memoria descriptiva, a menos que se limiten en casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo mayor.

El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 7 átomos de carbono, y más preferentemente de 1 a 5 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo y similares.

20 El término "alcanoilo" se refiere a alquil-C(O)-.

25 El término "adamantilo sustituido" se refiere a adamantilo, es decir, 1- o 2-adamantilo, sustituido por uno o más, por ejemplo, dos sustituyentes seleccionados de entre alquilo, -OR₁ o -NR₂R₃; donde R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno, alquilo, (alcanoilo de 1 a 8 átomos de carbono), carbamilo, o -CO-NR₄R₅; en donde R₄ y R₅ son independientemente alquilo, arilo sustituido o no sustituido y en donde uno entre R₄ y R₅ es adicionalmente hidrógeno o R₄ y R₅ juntos representan alquileno de 2 a 7 átomos de carbono.

El término "arilo" preferentemente representa fenilo. Fenilo sustituido preferentemente es fenilo sustituido por uno o más, por ejemplo, dos, sustituyentes seleccionados de entre por ejemplo, alquilo, alcoxi, halógeno y trifluorometilo.

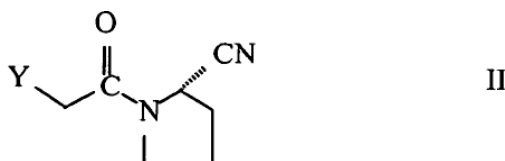
El término "alcoxi" se refiere a alquil-O-.

El término "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

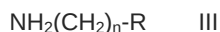
30 El término "alquileno" se refiere a un puente de cadena lineal de 2 a 7 átomos de carbono, preferentemente de 3 a 6 átomos de carbono, y lo más preferentemente de 5 átomos de carbono.

El término "sustancialmente puro" se entiende en el contexto de la presente invención que significa sustancialmente libre de material biológico tal como se encuentra en la sangre, especialmente menos del 10%, preferentemente menos del 1%, y lo más preferentemente libre de tal material biológico.

35 Los compuestos de la invención se pueden preparar por ejemplo por medio de un proceso que comprende el acoplamiento de un compuesto reactivo (2-cianopirrolidino)carbonil-metileno con una amina sustituida apropiada; más particularmente, para la preparación de los compuestos de la fórmula I, comprende la reacción un compuesto de fórmula II



40 en donde Y es un grupo reactivo (preferentemente un halógeno tal como bromo, cloro o yodo) con un compuesto de fórmula III

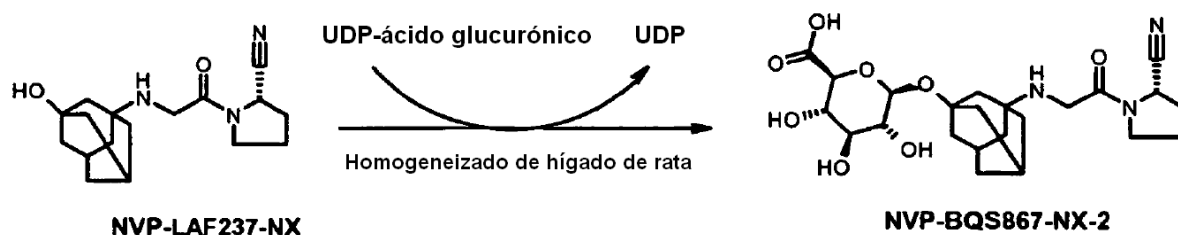


en donde R es como se definió anteriormente, y la recuperación del compuesto resultante de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B), en forma libre o en forma de una sal de adición ácida.

Procesos alternativos para preparar precursores de los compuestos de las fórmulas YA o YB se describen en las

- 5 Solicitudes de Patente WO 01/068603 o WO 05/095339 para los compuestos de fórmula XA o XB. Los procesos descritos anteriormente se pueden utilizar para obtener la forma del O-glucurónido de los compuestos descritos en las Solicitudes de Patente WO 01/068603 o WO 05/095339 y en donde R' es -OH.

- 10 La fracción de R' se puede unir a la estructura química por medio de cualquiera de los métodos bien conocidos por una persona capacitada en el arte o por medio del proceso descrito aquí más adelante para las estructuras de la fórmula química IA o IB. A través de bioconversión preparativa utilizando homogeneizado de hígado de rata como catalizador, se ha preparado el O-glucurónido de vildagliptina como se describe aquí más adelante.



- 15 Vildagliptina (NVP-LAF237-NX o Galvus®) es un nuevo fármaco oral hipoglucémico (anti-diabético) de la clase de inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) actualmente bajo revisión por parte de la FDA de los Estados Unidos. El solicitante ha descubierto sorprendentemente que el O-glucurónido de vildagliptina (figura AA) permanece tan activo como la vildagliptina. El solicitante ha descubierto sorprendentemente que el O-glucurónido de vildagliptina además de ser igualmente potente a la vildagliptina para la inhibición de la enzima DPP-4, es menos potente para la inhibición de las enzimas DPP-8 o DPP-9. Es particularmente inesperado que la sustitución del grupo adamantilo de un inhibidor de DPP-4 proporcione un mejor perfil farmacológico. El O-glucurónido de vildagliptina puede proporcionar otras ventajas farmacocinéticas o farmacológicas, por ejemplo, menos efectos secundarios, mejor biodisponibilidad.
- 20

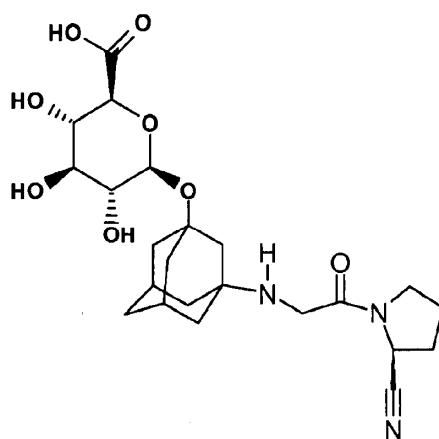


Figura AA

En una forma de realización más preferida, el O-glucurónido de vildagliptina (figura AA) está en una forma sustancialmente pura.

- 25 En las solicitudes de patente publicadas WO 2005/012249 (véase la reivindicación 2) y WO 00/34241 (véase la reivindicación 2), aparecen derivados de adamantali-cianopirrolidina como inhibidores de dipeptidil peptidasa IV, que son útiles para el tratamiento de la diabetes.

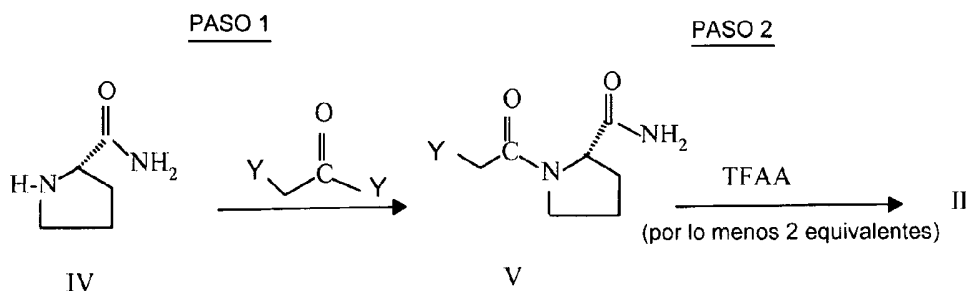
El proceso de la presente invención puede realizarse en forma convencional

Por ejemplo, el compuesto de la fórmula II reacciona con 1 a 3 equivalentes, preferentemente 3 equivalentes de una

amina primaria de fórmula III. La reacción se lleva a cabo conveniente en presencia de un solvente orgánico inerte, tal como cloruro de metileno o un éter cíclico tal como tetrahidrofurano. La temperatura preferentemente es de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 35°C, preferentemente aproximadamente entre 0°C y aproximadamente 25°C.

- 5 Los compuestos de la invención se pueden aislar de la mezcla de reacción y purificar de forma convencional, por ejemplo, por cromatografía.

Los materiales de partida también pueden se pueden preparar en forma convencional. Los compuestos de fórmula II pueden ser preparados por medio del siguiente esquema de reacción de dos pasos:



- 10 El paso 1 involucra la reacción de la pirrolidina de fórmula IV con un ligero exceso molar de un haloacetilhaluro tal como bromoacetilbromuro o cloroacetilcloruro y una base tal como carbonato de potasio o trietilamina. La reacción se lleva a cabo convenientemente en presencia de un solvente orgánico inerte, tal como tetrahidrofurano o un hidrocarburo alifático clorado tal como cloruro de metileno, a una temperatura de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 25°C, preferentemente a una temperatura de entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 15°C.
- 15

- El paso 2 se relaciona con la deshidratación del compuesto de fórmula V, preparado en el Paso 1, con 1 a 2 equivalentes de anhídrido trifluoroacético (TFAA). La deshidratación se lleva a cabo preferentemente en presencia de un solvente orgánico inerte tal como tetrahidrofurano o un hidrocarburo alifático clorado tal como cloruro de metileno, a una temperatura de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 25°C, preferentemente a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 15°C.
- 20

En la medida en que su preparación no es particularmente descrita aquí, un compuesto utilizado como material de partida es conocido o puede ser preparado a partir de compuestos conocidos en una forma conocida o en forma análoga con métodos conocidos o en forma análoga con los métodos descritos en el Ejemplo.

- 25 Por ejemplo, los compuestos de amina primaria de la fórmula III son conocidos y se pueden preparar mediante procedimientos documentados en la literatura, por ejemplo, Khim. en -Farm. Zh. (1986), 20(7), 810 - 15.

Finalmente, los compuestos de la invención se obtienen ya sea en la forma libre, o como una sal de los mismos si los grupos que forman la sal están presentes.

- Los compuestos de la invención que tienen grupos básicos pueden se pueden convertir en sales de adición ácida, especialmente sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables. Estas se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, un ácido fosfórico o ácido hidrohálico, o con ácidos carboxílicos orgánicos. Se prefieren las sales formadas con ácido clorhídrico.
- 30

En vista de la cercana relación entre los compuestos libres y los compuestos en la forma de sus sales, siempre que se hace referencia a un compuesto en este contexto, también se hace referencia a la sal correspondiente, siempre y cuando sea posible o apropiado bajo las circunstancias.

- 35 Los compuestos, incluidas sus sales, también se pueden obtener en la forma de sus hidratos, o incluir otros solventes usados para su cristalización.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas, por ejemplo, útiles en la inhibición de DPP-IV, que comprenden un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 40 La presente invención también se relaciona con el uso de un compuesto de a cuerdo con la presente invención o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades o condiciones asociadas con niveles elevados de DPP-IV.

Como se indicó anteriormente, todos los compuesto de las formulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B), y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, son útiles en la inhibición de DPP-IV. La capacidad de los compuestos de la invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, para la inhibición de DPP-IV se puede demostrar empleando el Ensayo de DPP-IV de Caco-2 que mide la capacidad de los compuestos del ensayo para la inhibición de la actividad de DPP-IV de extractos de células de carcinoma colónico humano. La línea de células de carcinoma colónico humano Caco-2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC HTB 37). La diferenciación de las células para inducir la expresión de DPP-IV se logró como lo describen Reisher, et al., en un artículo titulado "Increased expression of intestinal cell line Caco-2" en Proc. Natl. Acad. Sci., Volumen 90, páginas 5757 - 5761 (1993). El extracto se preparó a partir de células solubilizadas en Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, aprotinina 0,04 t.i.u., monidet-P40 al 0,5%, pH 8,0, que se centrifuga a 35,000 g durante 30 minutos, a 4°C para remover los residuos celulares. El ensayo se realiza por medio de la adición de 20 µg de proteína Caco-2 solubilizada, diluida hasta un volumen final de 125 µl en amortiguador del ensayo (Tris HCl 125 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 10 mM, albúmina de suero bovino al 1%) en pozos de una placa del microtitulación. Después de incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se inicia la reacción por medio de la adición de 25 µl de sustrato 1 mM (H-Alanina-Prolina-pNA; pNA es p-nitroanilina). La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos, después de los cuales se añade un volumen de 19 µl de ácido acético glacial al 25% para detener la reacción. Se añaden típicamente los compuestos del ensayo como adiciones de 30 µl y se reduce el volumen del amortiguador del ensayo hasta 95 µl. Se genera una curva estándar de p-nitroanilina libre utilizando soluciones de 0 - 500 µM de la pNA libre en amortiguador del ensayo. La curva generada es lineal y se usa para interpolación del consumo del sustrato (actividad catalítica en nmoles del sustrato escindido/minuto). El punto final se determina midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de microtitulación UV Max de Molecular Devices.

La potencia de los compuestos de ensayo como inhibidores de DPP-IV, expresada como IC₅₀, se calcula a partir de curvas de respuesta a la dosis de 8 puntos utilizando una función logística de 4 parámetros.

La capacidad de los compuestos de la invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, para la inhibición de DPP-IV se puede demostrar también midiendo los efectos de los compuestos de ensayo sobre la actividad de DPP-IV en plasma humano y de rata empleando una versión modificada del ensayo descrito por Kubota et al., en un artículo titulado "Involvement of dipeptidylpeptidase IV in an in vivo immune response" en Clin. Exp. Immunol., Volumen 89, páginas 192 - 197 (1992). En resumen, se añaden 5 µl de plasma a placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos (Falcon), seguido por la adición de 5 µl de MgCl₂ 80 mM en amortiguador de incubación (HEPES 25 mM, NaCl 140 mM, BSA grado RIA al 1%, pH 7,8). Después de incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se inicia la reacción por medio de la adición de 10 µl de amortiguador de incubación que contiene sustrato 0,1 mM (H-Glicina-Prolina-AMC; AMC es 7-amino-4-metilcumarina). Las placas se cubren con papel de aluminio (o se mantienen en la oscuridad) y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de los 20 minutos de reacción se mide la fluorescencia utilizando un fluorímetro CytoFluor 2350 (Excitación 380 nm, Emisión 460 nm; ajuste de sensibilidad 4). Los compuestos del ensayo se añaden típicamente como adiciones de 2 µl y se reduce el volumen del amortiguador del ensayo hasta 13 µl. Se genera una curva de concentración/fluorescencia de AMC libre utilizando soluciones 0 - 50 µM de AMC en amortiguador del ensayo. La curva generada es lineal y se usa para interpolación del consumo de sustrato (actividad catalítica en nmoles del sustrato escindido/minuto). Como con el ensayo anterior, la potencia de los compuestos del ensayo como inhibidores de DPP-IV, expresada como IC₅₀, se calcula a partir de las curvas de respuesta a la dosis de 8 puntos utilizando una función logística de 4 parámetros.

En vista de su capacidad para la inhibición de DPP-IV, los compuestos de la invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, se utilizan en condiciones de tratamiento mediadas por la inhibición de DPP-IV. Con base en lo anterior y en los hallazgos en la literatura, se esperaba que los compuestos divulgados aquí sean útiles en el tratamiento de condiciones tales como diabetes mellitus no dependiente de insulina, artritis, obesidad, trasplante de aloinjertos y osteoporosis por calcitonina. Además, con base en los roles de péptidos tales como el glucagón (tales como GLP-I y GLP-2) y su asociación con la inhibición de DPP-IV, se esperaba que los compuestos divulgados aquí sean útiles, por ejemplo, para producir un efecto sedante o ansiolítico, o para atenuar cambios catabólicos post-quirúrgicos y respuestas hormonales al estrés, o para reducir la mortalidad y morbilidad después de un infarto al miocardio, o en el tratamiento de condiciones relacionadas con los efectos anteriores que pueden ser mediados por niveles de GLP-1 y/o GLP-2.

Más específicamente, por ejemplo, los compuestos de la invención y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, mejoran la respuesta temprana a la insulina para un reto de glucosa oral y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina. La capacidad de los compuestos de la invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, para mejorar la respuesta temprana a la insulina para un reto de glucosa oral se puede medir en ratas resistentes a la

insulina de acuerdo con el siguiente método:

5 Se mantuvieron en ayuno aproximadamente durante 2 horas ratas macho Sprague-Dawley que habían sido alimentadas con una dieta rica en grasas (grasas saturadas = 57% de calorías) durante 2 - 3 semanas, el día del análisis, divididas en grupos de 8 - 10, y recibieron dosis orales con 10 μ moles/kg de los compuestos del ensayo en CMC. Se administró un bolo oral de glucosa de 1 g/kg 30 minutos después del compuesto del ensayo directamente en el estómago de los animales analizados. Se analizaron muestras de sangre, obtenidas en diferentes momentos de los catéteres crónicos de la vena yugular, para las concentraciones de glucosa en plasma y de insulina inmunorreactiva (IRI), y la actividad en el plasma de DPP-IV. Se analizaron los niveles de insulina en plasma por medio de un método de radioinmunoensayo (RIA) de anticuerpo doble utilizando un anticuerpo específico de insulina anti-rata de Linco Research (St. Louis, MO). El RIA tiene un límite inferior de detección de 0,5 μ U/mL con variaciones entre los ensayos y dentro de los ensayo de menos del 5%. Los datos se expresan como el % de aumento del promedio de los animales del control. Después de la administración oral, cada uno de los compuestos analizados amplificó la respuesta temprana a la insulina lo que condujo a una mejora en la tolerancia a la glucosa en los animales del ensayo resistentes a la insulina. Se obtuvieron los siguientes resultados:

15 La dosis precisa de los compuestos de la invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, que se emplean para tratar condiciones mediadas por la inhibición de DPP-IV depende de varios factores, incluido el huésped, la naturaleza y la severidad que está siendo tratado, el modo de administración y el compuesto particular empleado. Sin embargo, en general, las condiciones mediadas por la inhibición de DPP-IV son tratadas efectivamente cuando un compuesto de la invención, o una sal correspondiente de adición ácida farmacéuticamente aceptable, se administra de forma enteral, por ejemplo, en forma oral o en forma parenteral, por ejemplo, en forma intravenosa, preferentemente en forma oral, con una dosis diaria de 0,002 - 5, preferentemente de 0,02 - 2,5 mg/kg de peso corporal o, para los primates mayores, una dosis diaria de 0,1 - 250, preferentemente 1 - 100 mg. Una unidad de dosificación oral típica es de 0,01 - 0,75 mg/kg, una a tres veces al día. Usualmente, se administra inicialmente una dosis menor y se incrementa gradualmente la dosis hasta que se determina la dosis óptima para el huésped bajo tratamiento. El límite superior de la dosis es aquel impuesto por los efectos secundarios y se puede determinar mediante un ensayo para el huésped que está siendo tratado.

30 Los compuestos de la presente invención, y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, se pueden combinar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más de otros adyuvantes farmacéuticos convencionales y se administran de forma entérica, por ejemplo, en forma oral, en la forma de tabletas, cápsulas, pastillas, etc., o en forma parenteral, por ejemplo, en forma intravenosa, en la forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles. Las composiciones enterales y parenterales se puede preparar por medios convencionales. Los ejemplos de formulaciones adecuadas que contienen los compuestos de la invención se describen en las Solicitudes de Patente WO 2005/067976 o WO 2006/078593.

35 Por lo tanto, la invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o los compuestos descritos aquí, en la forma libre o en la forma de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable, junto con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son aquellas adecuadas para administración entérica, tal como oral o rectal; administración transdérmica y parenteral a mamíferos, incluidos humanos, para el tratamiento de condiciones mediadas por la actividad de DPP4. Tales condiciones incluyen tolerancia inadecuada a la glucosa, diabetes Tipo 2 y obesidad.

45 De este modo, los compuestos farmacológicamente activos de la invención se pueden emplear en la fabricación de composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva de los mismos conjunto o mezcla con excipientes o vehículos adecuados ya sea para aplicación enteral o parenteral. Se prefieren las tabletas y cápsulas de gelatina que contienen el ingrediente activo junto con:

a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina;

b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilén glicol; para tabletas también

50 c) aglomerantes, por ejemplo, silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona; si se desea

d) desintegrantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o

e) absorbentes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Dichas composiciones se pueden esterilizar y/o contienen adyuvantes, tales como agentes preservantes, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, promotores de solución, sales para regulación de la presión osmótica y/o amortiguadores. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente 0,1 - 75%, preferentemente de aproximadamente el 1 - 50%, del ingrediente activo.

Las formulaciones adecuadas para la aplicación transdérmica incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención con un vehículo. Vehículos adecuados incluyen solventes que pueden ser absorbidos farmacológicamente aceptables para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Característicamente, los dispositivos transdérmicos están en la forma de una venda que comprende una pieza de respaldo, un recipiente que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de controla la velocidad para suministro del compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un período de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas como se describió anteriormente para el tratamiento de condiciones mediadas por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV, preferentemente, la tolerancia inadecuada a la glucosa, diabetes Tipo 2 y obesidad.

La presente invención también proporciona el uso de una composición farmacéutica como se describió anteriormente para el tratamiento de condiciones mediadas por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV, preferentemente, tolerancia inadecuada a la glucosa, diabetes Tipo 2 y obesidad, en donde el compuesto de la invención (como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4) se administra en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, uno o dos agentes adicionales, como se describe aquí más adelante.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención como se define aquí (por ejemplo, en las reivindicaciones 1 a 4), ya sea solas o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, cada uno en una dosis terapéuticamente efectiva como la reportada en la técnica. Tales agentes terapéuticos incluyen:

a) agentes antidiabéticos, tales como insulina, derivados de insulina y miméticos; secretagogos de insulina tales como las sulfonilureas, por ejemplo, Glipizida, gliburida y Amarilo; ligandos del receptor insulínico tales como meglitinidas, por ejemplo, nateglinida y repaglinida; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) tales como PTP-112; inhibidores de GSK3 (glucógeno sintasa quinasa-3) tales como SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 y NN-57-05445; ligandos de RXR tales como GW-0791 y AGN-194204; inhibidores del cotransportador de glucosa que depende sodio tales como T-1095; inhibidores de glucógeno fosforilasa A tales como BAY R3401; biguanidas tales como metformina; inhibidores de alfa-glucosidasa tales como acarbose; GLP-1 (péptido-1 del tipo glucagon), análogos de GLP-1 tales como los miméticos Exendina-4 GLP-1; e inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) tales como vildagliptina;

b) agentes hipolipidémicos tales como inhibidores de la reductasa 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA), por ejemplo, lovastatina, pitavastatina, simvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, atorvastatina, rosuvastatina y rivastatina; inhibidores de escualeno de sintasa; ligandos de FXR (receptor de farnesoide X) y LXR (receptor del hígado X); colestiramina; fibratos; ácido nicotínico, resinas de enlazamiento de ácido biliar tales como colestiramina; fibratos; ácido nicotínico y otros agonistas de GPR109; inhibidores de la absorción de colesterol tales como ezetimibe; inhibidores de CETP (inhibidores de colesterol-éster-transfer-proteína); y aspirina;

c) agentes contra la obesidad tales como antagonistas de orlistat, sibutramina y Receptor 1 de Canabinoide (CB1), por ejemplo, rimonabant; y

d) agentes anti-hipertensivos, por ejemplo, diuréticos de bucle tales como ácido etacrinico, furosemida y torsemida; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perinodopril, quinapril, ramipril y trandolapril; inhibidores de la bomba de la membrana de Na-K-ATPasa tales como digoxina; inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP); inhibidores de ACE/NEP tales como omapatrilat, sampatrilat y fasidotril; antagonistas de angiotensina II tales como candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan y valsartan, en particular valsartan; inhibidores de renina tales como ditekireno, zankireno, terlakireno, aliskireno, RO 66-1132 y RO-66-11068; bloqueadores del receptor β -adrenérgico tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metaprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; agentes inotrópicos tales como digoxina, dobutamina y milrinona; bloqueadores de canales de calcio tales como amlodipina, bepridil, diltiazem, felodipina, nicardipina, nimodipina, nifedipina, nisoldipina y verapamilo; antagonistas del receptor de aldosterona; e

inhibidores de aldosterona sintasa.

- 5 e) agonistas de receptores de receptores de proliferadores-activadores de peroxisoma, tales como fenofibrato, pioglitazona, rosiglitazona, tesaglitazar, BMS-298585, L-796449, los compuestos específicamente descritos en la Solicitud de Patente WO 2004/103995, es decir compuestos de los ejemplos 1 a 35 o compuestos específicamente enlistados en la reivindicación 21, o los compuestos específicamente descritos en la Solicitud de Patente WO 03/043985, es decir compuestos de los ejemplos 1 a 7 o compuestos específicamente enlistados en la reivindicación 19 y especialmente (R)-1-{4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-oxazol-4-ilmetoxi]-bencenosulfonil}-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico o una sal del mismo.

Por lo tanto, la invención cubre las composiciones farmacéuticas que comprenden:

- 10 i) un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
- ii) al menos un compuesto seleccionado de
- a) agentes antidiabéticos,
- b) agentes hipolipidémicos,
- c) agentes contra obesidad,
- 15 d) agentes anti-hipertensivos,
- e) agonistas de receptores de receptores de proliferadores-activadores de peroxisoma,
- iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 20 Otros compuestos contra la diabetes específicos son descritos por Patel Mona en Expert Opin Investig Drugs, 2003, 12(4), páginas 623 - 633, en las figuras 1 a 7. Un compuesto de la presente invención se puede administrar ya sea en forma simultanea, antes o después de otro ingrediente activo, ya sea en forma separada por la misma ruta o una ruta diferente de administración o juntos en la misma formulación farmacéutica.

La estructura de los agentes terapéuticos identificados por los números de código, nombres comerciales o genéricos se pueden tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications).

- 25 Por lo tanto, la presente invención provee composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de otro agente terapéutico, preferentemente seleccionado de entre agentes anti-diabéticos, hipolipidémicos, contra la obesidad o agentes anti-hipertensivos, más preferentemente a partir de agentes anti-diabéticos o hipolipidémicos como se describió anteriormente.

- 30 La presente invención se relaciona además con composiciones farmacéuticas como se describió anteriormente para uso como un medicamento.

- 35 La presente invención se relaciona además con el uso de composiciones o combinaciones farmacéuticas como se describió anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de condiciones mediadas por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV, preferentemente, la tolerancia inadecuada a la glucosa, diabetes Tipo 2 y obesidad.

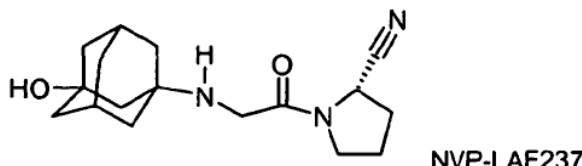
- 40 Los compuestos de la invención y sus correspondientes sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, se pueden formular en composiciones farmacéuticas enterales y parenterales que contienen una cantidad de la sustancia activa que es efectiva para el tratamiento de condiciones mediados por la inhibición de DPP-IV, tales composiciones en forma de dosis unitarias y tales composiciones conteniendo un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención (incluidas aquellas de cada uno de los sub-ámbitos de los mismos y cada uno de los ejemplos) se pueden administrar en forma enantioméricamente pura (por ejemplo, ee > 98%, preferentemente > 99%) o junto con el enantiómero R, por ejemplo, en forma racémica. Los rangos anteriores de dosificación se basan en los compuestos de la invención (excluyendo la cantidad del enantiómero R).

Los siguientes ejemplos muestran compuestos representativos abarcados por esta invención y su síntesis. Sin embargo, debe entenderse claramente que son únicamente para propósitos de ilustración.

I. Ejemplo 1

Pirrolidina, 1-[(3-hidroxi-1-adamantil)amino]acetil-2-ciano-, (S) (INN: vildagliptina) o NVP-LAF237



A. 1-Aminoadamantano-3-ol:

Se pueden utilizar ligeras modificaciones a la síntesis encontrada en Khim, en -Farm. Zh. (1986), 20(7), páginas 810 - 15.

A una mezcla enfriada en hielo-agua, clara e incolora y agitada rápidamente de ácido sulfúrico concentrado al 96% (210 mL; 3.943 mmoles) y ácido nítrico al 65% (21,0 mL; 217,0 mmoles), se le añaden 21,0 g (112,0 mmoles) de clorhidrato de 1-adamantilamina (99%), en pequeñas porciones durante 30 minutos. Después de la adición de clorhidrato de adamantilamina, ocurre un ligero burbujeo y la reacción es ligeramente exotérmica. Esta solución amarilla burbujeante, se agita a temperatura de hielo-agua aproximadamente durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante 30 horas. Esta reacción transparente de color amarillo claro se vierte luego aproximadamente en 100 g de hielo, y la solución resultante es de color verde-azul claro.

La solución se coloca en un baño de hielo-agua y se le deja agitación durante 30 minutos. Se añaden entonces aproximadamente 550 g de KOH puro al 89% (8,74 moles) en pequeñas porciones durante 45 minutos. Durante esta adición, la reacción es exotérmica, alcanzando los 80°C y produciendo copiosas cantidades de gas NO₂ de color marrón. Al final de la adición, la reacción es densa con sólidos de color blancos (tanto producto como sales). La pasta de color blanco resultante se vierte entonces sobre una almohadilla de Celite en un embudo Buchner y se lava con 1,2 L de CH₂Cl₂. La capa de CH₂Cl₂ se extrae luego de la capa acuosa y se seca sobre Na₂SO₄. Se filtra luego la solución y se concentra (evaporador rotatorio/bomba) para producir 1-aminoadamantano-3-ol como un sólido de color blanco.

B. 1-Cloroacetil-2-cianopirrolidina

A una solución mecánicamente agitada de 20,0 g (180,0 mmoles) de cloroacetilcloruro y 97 g (0,70 mmoles) de carbonato de potasio en 150 mL de tetrahidrofurano, se le añade gota a gota durante 45 minutos, una solución de L-prolinamida 20,0 g (180,0 mmoles) en 500 mL de tetrahidrofurano. Esta reacción se agita luego mecánicamente durante dos horas más a temperatura ambiente. La reacción se filtra luego para remover las sales de potasio, y se seca el filtrado sobre Na₂SO₄. Se remueve luego el Na₂SO₄ por medio de filtración y a éste filtrado incoloro se le añade anhídrido trifluoroacético (25,0 mL, 0,180 mmoles) en una porción. Se agita luego magnéticamente la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente, y la solución clara resultante de color amarillo/anaranjado se concentra por medio de un evaporador rotatorio. Se remueve el exceso de anhídrido trifluoroacético por medio de la adición de acetato de etilo al aceite concentrado y se lo reconcentra por medio de un evaporador rotatorio. Esta operación de remoción se lleva a cabo tres veces.

El aceite resultante se reparte entre el acetato de etilo y el agua. Se extrae entonces el producto en el acetato de etilo, y la capa acuosa se lava luego dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavan entonces sucesivamente con agua y salmuera y se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentran para obtener 1-cloroacetil-2-cianopirrolidina como un sólido de color amarillo.

C. Pirrolidina, 1-[(3-hidroxi-1-adamantil)amino]acetil-2-ciano-, (S)

A una solución heterogénea del compuesto del título A (1-aminoadamantano-3-ol) (5,80 g, 34,7 mmoles) en CH₂Cl₂ (68,0 mL) se le añaden 9,6 g (69 mmoles) de K₂CO₃. Esta mezcla heterogénea se enfría luego en un baño de hielo-agua y se añade gota a gota y durante un período de 30 minutos, una solución de 3,0 g (17 mmoles) del compuesto del título B (1-cloroacetil-2-cianopirrolidina) disuelta en 25,0 mL de CH₂Cl₂. La mezcla resultante se agita durante 2 horas a 0°C y a temperatura ambiente durante 6 días. Se concentra entonces la reacción para obtener un material pastoso de color amarillo que se purifica sobre gel de sílice empleando un sistema de cromatografía Flash SIMS/Biotage y una solución al 7% de metanol en cloruro de metileno como el eluyente, para producir el compuesto

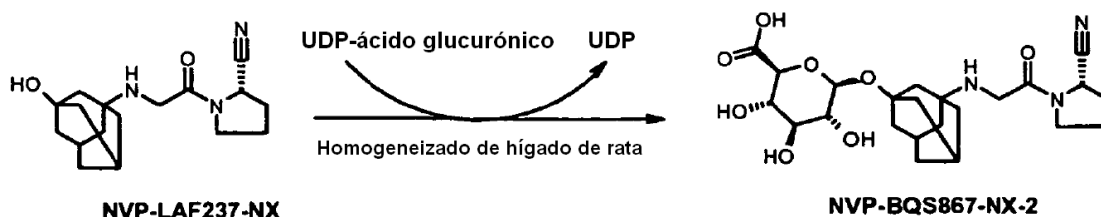
del título en forma de una base libre como un sólido cristalino de color blanco (punto de fusión 138°C - 140°C, RMN ^{13}C (ppm) = 119,59).

A. D. Síntesis biocatalítica de NVP-BQS867 (el O-glucurónido de vildagliptina) y NVP-BRU563 (el O-glucurónido de vildagliptina marcado).

- 5 El esquema de reacción de la glucuronidación enzimática de NVP-LAF237 bajo catálisis del homogeneizado de hígado de rata se muestra en la figura 4-1.

(i) Figura I-1

Biotransformación de NVP-LAF237



2.

3. 1. Preparación del homogeneizado de hígado de rata

- 10 Se descongelaron dos porciones de 15 g y una de 11 g de hígado de rata y se cortaron en pequeños pedazos. Después de la adición de un equivalente de 0,5 volúmenes de solución de NaCl al 0.9% enfriada en hielo a cada porción de hígado y mezclando en un mezcladora Dispomix, se homogenizó el tejido en un homogenizador de tejido "Potter S" (Braun Biotech Inc., Melsungen, Alemania) enfriando en agua con hielo removiendo el pistilo de teflón 3 veces hacia arriba y hacia abajo a ciento por ciento de la velocidad del agitador. Se llevó el homogeneizado hasta un peso final de 81 g y se centrifugó a 4°C - 6°C durante 30 minutos a 10,000 rpm (= 17,000 x g) en una centrífuga Beckmann Coulter (Fullerton, CA, EUA) tipo Avanti J-HC equipada con un rotor JA-10. El sobrenadante sirvió como la fuente de la enzima.

4. 2. Bioconversión a escala preparativa

- 20 Las condiciones para la glucuronidación del NVP-LAF237 (vildagliptina) a escala de 340 mg fueron: NVP-LAF237 5 mM, UDP-glucuronato (Yamasa Co., Tokyo, JP) 20 mM, MgCl_2 20 mM, HEPES 160 mM, pH 8,5, homogeneizado de hígado de rata al 20% v/v, volumen total 224 ml, incubación durante 5 horas a 37°C y además 14 horas a 30°C. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos Nunc de 50 ml cada uno lleno con 20 ml de la mezcla de la reacción, que fueron agitados a 170 rpm en una agitadora microbiológica de laboratorio con un radio de agitación de 5 cm.

- 25 La reacción preparativa se detuvo por medio de la adición de 224 ml de acetonitrilo y se mezcló durante 10 minutos a 20°C. Después de centrifugación durante 15 minutos a 8000 rpm (rotor JA-10), se suspendió el precipitado en 50 ml de acetonitrilo al 50% v/v en agua desionizada y se centrifugó nuevamente. Se concentraron los sobrenadantes combinados hasta 50 ml a presión reducida a 25°C. Se centrifugó el concentrado turbio a 5000 rpm, y después de filtrar el sobrenadante a través de fibra de vidrio fue sometido a HPLC preparativa.

- 30 Para la glucuronidación de NVP-LAF237 marcada con [$^{13}\text{C}_5$ ^{15}N] (escala de 50 mg), las condiciones de la biotransformación fueron las mismas que para NVP-LAF237 a escala de 340 mg excepto porque la concentración del UDP-glucuronato fue de 80 mM, de homogeneizado de hígado de rata al 30% v/v, el volumen de llenado de los tubos Nunc fue de 16,5 ml, el volumen total 33 ml, el tiempo de reacción 4 horas y la velocidad de agitación 200 rpm.

- 35 La reacción se detuvo por medio de la adición de 16,5 ml de acetonitrilo a cada tubo, incubación durante 15 minutos sobre hielo y posterior mezcla. Después de centrifugación durante 15 minutos 17,000 rpm (rotor JA-10), se resuspendió el sedimento en 20 ml de acetonitrilo al 50% v/v en agua desionizada y se centrifugó nuevamente. Se concentraron los sobrenadantes combinados hasta 10 ml a presión reducida a 30°C, se diluyó nuevamente hasta un volumen final de 25 ml y se centrifugó para una clarificación final. Se resuspendió el precipitado con 5 ml de agua desionizada, y después de la centrifugación, se combinaron los dos últimos sobrenadantes y se los sometió a HPLC preparativa.

- 40 Medición de la conversión/HPLC-DAD analítica: 50 μl de una muestra de 19 h del lote de 340 mg de NVP-LAF237 y 25 μl de una muestra de 4 h del lote con NVP-LAF237 marcado con [$^{13}\text{C}_5$ ^{15}N] se mezclaron cada uno con 200 μl de acetonitrilo al 50% en agua y se centrifugó en una centrífuga refrigerada Sigma 4K 15C. Se analizó el sobrenadante

por medio de RP₁₈-HPLC-DAD analítica (HPLC-DAD serie 1100 de Agilent Technologies, Basilea, Suiza; dos columnas conectadas del tipo Chromolith Performance RP-18e 100 x 4,6 mm con un Cartucho de Protección Chromolith RP-18e 5 x 4,6 mm (Merck); flujo 2 ml/min; fase móvil A: H₃PO₄ acuoso 3 mM, fase móvil B: acetonitrilo; gradiente del 3% hasta 15% de B en 5 minutos; detección DAD a 200 - 400 nm). La conversión se basó en las áreas del pico de absorción de UV a 205 nm de la glucurónida y NVP-LAF237.

5. E. Purificación de los metabolitos

a) a) NVP-BQS867-NX-2

Se usó una parte (5 ml o aproximadamente 10%) de materia prima bioconvertida para la preparación del lote NVP-BQS867-NX-2. A este volumen, se le añadieron 35 ml de NH₄Ac acuoso 10 mM y 8 ml de metanol. El pH se ajustó a 7 con ácido acético diluido. Se utilizó luego esta mezcla como solución de inyección para cromatografía líquida preparativa.

El sistema de espectrometría de masas-cromatografía líquida preparativa consistió de un sistema de Autopurificación de Waters (Waters Corp. Milford, MA, EUA) con una bomba 2525, un administrador de muestra 2767, un detector de fotodiodo 2996, una bomba de preparación 515, un espectrómetro de masas ZQ2000 y los software MassLynx 4.0 y FractionLynx 4.0.

Se empleó una columna Atlantis dC18, 5 µm de 19 mm x 100 mm (Waters); velocidad de flujo de 20 ml/min; fase móvil A: NH₄Ac acuoso 10 mM, pH 7,0; fase móvil B: CH₃CN/CH₃OH en proporción 4:1, NH₄Ac 10 mM; programa de gradiente: 0 minutos, 5% de B; 2 minutos 5% de B; 7 minutos 20% de B; 7,1 - 12 minutos 95% de B; 12,1 - 14 minutos 5% de B; volumen de inyección 1 - 5 ml. Se dividió el efluente de la columna, una parte muy pequeña se mezcló en línea con preparación de 2-propanol/H₂O/HCOOH líquido en proporción 400:100:1 y se lo introdujo en la fuente de iones del espectrómetro de masas; el resto entró al detector DAD registrando desde 200 - 600 nm, y posteriormente el administrador de la muestra para la recolección de las fracciones.

El espectrómetro de masas estaba equipado con una interfaz ESCi usada en el modo ESI positivo. Se aplicó un voltaje capilar de 3 kV y un voltaje de cono de 30 V; rango de masa 250 - 550 Da.

Se recolectó la fracción objetivo con base en un tiempo de 5,3 - 6,7 minutos. Las fracciones objetivo de 12 corridas de HPLC se combinaron, se removió el solvente orgánico a presión reducida a 30°C, y se liofilizó la solución restante a -80°C, y 0,2 mbar produciendo 15 mg como un liofilizado casi incoloro.

Se determinó la pureza por HPLC-DAD y HPLC-MS (véase la sección 2.2.2): Aparte de las sales (acetato de amonio) y el agua, el lote de NVP-BQS867-NX-2 tenía una pureza de > 97%.

b) b) NVP-BRU563-NX-1 (glucurónido marcado en forma estable)

Se añadió un volumen igual de solución de NH₄Ac 20 mM al extracto acuoso para formar una concentración de NH₄Ac de 10 mM. Se ajustó la mezcla a un pH de 7,0 con ácido acético diluido y luego se la utilizó como una solución de inyección para cromatografía líquida preparativa.

El sistema de espectrometría de masas-cromatografía líquida preparativa se describe en 2.1.3.1.

Se empleó una columna Atlantis Prep dC18 OBD, 5 µm, 30 mm x 150 mm (Waters); velocidad de flujo 40 ml/min; fase móvil A: NH₄Ac acuoso 10 mM; fase móvil B: CH₃CN/CH₃OH en proporción 4:1 + NH₄Ac 10 mM, pH 7,0; programa de gradiente; 0 minutos, 5% de B; 2 minutos 5% de B; 7 minutos 20% de B; 7,1 - 12 minutos 95% de B; 12,1 - 14 minutos 5% de B; volumen de inyección 2 - 6 ml. Se dividió el efluente de la columna de la misma forma como se describió en 2.1.3.1.

El espectrómetro de masas estaba equipado con una interfaz ESCi utilizada en modo ESI positivo. Se aplicó un voltaje capilar de 3 kV y un voltaje de cono de 30 V; rango de masa de 100 - 1000 Da.

Se recolectó la fracción objetivo con base en un tiempo de 7,0 - 9,0 minutos. Las fracciones objetivo de 12 corridas de HPLC se combinaron, se removió el solvente orgánico a presión reducida a 30°C, y se liofilizó la solución restante a -80°C, y 0,2 mbar produciendo 63 mg como un liofilizado casi incoloro.

Se determinó la pureza por HPLC-DAD y HPLC-MS (véase la sección 2.2.2): Aparte de las sales (acetato de amonio) y el agua, el lote de NVP-BRU563-NX-1 tenía una pureza de > 98%.

B. F. Análisis para la identificación de la estructura

1. Espectroscopía de RMN

Se disolvieron los compuestos en 5 µl de DMSO-d₆ y se los colocó en un tubo de RMN de 1mm de diámetro. A partir de NVP-BQS867, se obtuvieron un espectro 1D-¹H y espectros 2D homo y heteronucleares (COSY, HSQC, HMBC, ROESY). A partir de NVP-BRU563, se midió un espectro de ¹H. Todos los espectros se registraron a 300°K en un espectrómetro Bruker DRX600, usando una sonda de microtitulación ¹H {¹³C, ¹⁵N}. A partir de NVP-BQS867, se midió un espectro ¹³C en un espectrómetro Bruker DRX600 utilizando una Criosonda ¹³C {¹H} de 5 mm.

2. 2. Espectrometría de masas-HPLC

La cromatografía líquida consistió de un Waters UPLC Acquity (Waters) equipado con un detector de PDA-2996 Waters Acquity 2996. Columna: Acquity UPLC BEH C18; 1,7 µm; 1,0 x 150 mm (Waters); velocidad de flujo de 0,1 ml/min.; eluyente A: H₂O/TFA en proporción 100:0,1; eluyente B: acetonitrilo/TFA en proporción 100:0,1; gradiente: 0 minutos 5% de B; 1 minuto 5% de B, 11 minutos 40% de B; 13 - 16 minutos 95% de B; 30°C; detección UV: 200 - 350 nm, resolución 2,4 nm; volumen de inyección de 5 µl. Se disolvió la sustancia en agua/acetonitrilo en proporción 9:1 en una concentración de aproximadamente 0,3 mg/ml. La evaluación de la pureza se hizo por medio de UV a 210 nm como el % del área del pico deseado. Se introdujo el efluente de la columna directamente en la fuente de iones del MS.

Se utilizó un espectrómetro de masas TSQ Quantum AM (Thermo, San José, CA, EUA) equipado con interfaz de electroaspersión en el modo positivo. Se operó con un software Xcalibur versión 2.0. Se utilizó un ajuste de gas envolvente de 25 unidades y de gas auxiliar de 5 unidades y se aplicó un voltaje de aspersión de 3 kV. Se mantuvo el capilar metálico caliente a 300°C; rango de masa de 200 a 800 Da. Parámetros de MS/MS: gas de colisión argón a 1,5 mTorr; energía de colisión 25 V.

II. G. Resultados:

A. 1. Síntesis biocatalítica

Para las dos reacciones preparativas la HPLC-DAD analítica produjo los siguientes valores de conversión: 66% para el lote con 340 mg de NVP-LAF237 y 94% para el lote con NVP-LAF237 marcado con [¹³C₅ ¹⁵N] (50 mg).

2. Purificación de los glucurónidos

Como se describió en la sección anterior, se obtuvieron 15 mg de O-glucurónidos NVP-BQS867-NX-2 por medio de HPLC-MS preparativa a partir de 5 ml de extracto de cultivo acuoso obtenido de la biotransformación. A partir de la reacción preparativa completa con 340 mg de NVP-LAF237, se aislaron 4 lotes de NVP-BQS867-NX (NX-1 a NX-4) con una cantidad total de 295 mg de O-glucurónido.

3. Elucidación de la estructura.

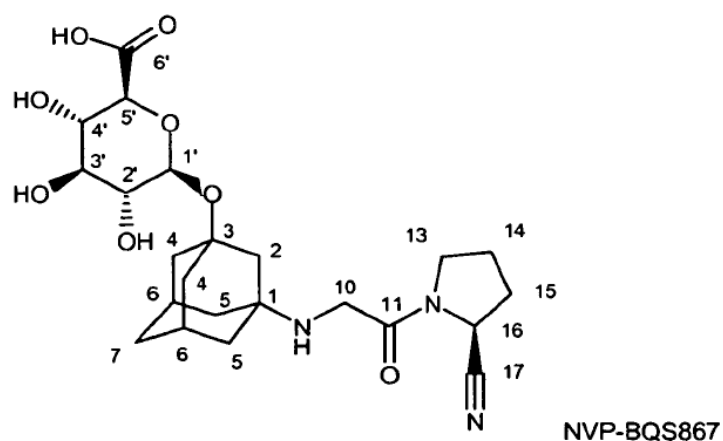
El espectro de masas de NVP-BQS867-NX-2 muestra un [M + H]⁺ de 480,1 sugiriendo un peso molecular de 479. Esto es consistente con un glucurónido de NVP-LAF237. El espectro de iones del producto MS/MS muestra la pérdida de glucurónido (m/z 304) así como de ácido glucurónico (m/z 286).

La estructura de NVP-BQS867-NX-2 (figura 3 - 1) se elucidó de forma no ambigua con base en la espectroscopia RMN. Las principales diferencias de los espectros de RMN de NVP-BQS867 comparado con NVP-LAF237 son principalmente las resonancias obtenidas a partir de la fracción de glucurónido. El desplazamiento de ¹H- (4,42 ppm) y del ¹³C (96,4 ppm) de la resonancia 1' anomérica del ácido glucurónico indicó que este último está unido al oxígeno y no al nitrógeno. Una correlación de HNBC de H-1' con C-3 y correlaciones ROESY H-1' con H-2 y H-4 confirmaron la estructura mostrada en la figura 3-1 en forma no ambigua.

La interpretación de todos los datos de RMN y las correlaciones condujo a una única estructura que está de acuerdo con el resultado de MS (MW = 479, m/z MH⁺ = 480,1). Un resumen de todos los desplazamientos de ¹H y ¹³C y las correlaciones homo- y heteronucleares relevantes es mostrada en la Tabla 3-1.

El compuesto NVP-BRU563-NX-3, biosintetizado a partir de NVP-LAF237 marcado con [U-pirrolidina, ciano-¹³C₅, pirrolidina-¹⁵N], mostró propiedades espectrales idénticas con NVP-BQS867-NX con las excepciones esperadas para la etiqueta estable: la MH⁺ de 486,2 es 6 Da mayor que aquella de NVP-BQS867-NX y en el espectro de iones del producto MS/MS algunos fragmentos también están desplazados.

(i) Figura II-1 Estructura de NVP-BQS867 con el esquema de numeración utilizada en la Tabla 3-1 y el espectro ¹H

(b) Tabla II-1 asignaciones de ^1H y ^{13}C para la estructura de NVP-BQS867

Posición	Grupo	Desplazamiento de ^1H	Desplazamiento de ^{13}C	Correlación de HMBC	Correlaciones de NOE
1	Cq		53,6	H-10, H-2, H-5	
2	CH_2	1,74, 1,60	46,6		H-1'
3	Cq		75,4	H-1', H-2, H-4	
4	2x	1,70, 1,67	41,9, 41,6		H-1'
	CH_2	1,60			
5	2x	1,55	41,4, 41,1		
	CH_2				
6	2 x CH	2,20	30,5, 30,6		
7	CH_2	1,48, 1,43	35,5		
10	CH_2	3,53, 3,49	43,5		
11	CO		170,9	H-10	
13	CH_2	3,64, 3,46	45,7		
14	CH_2	2,06, 1,99	25,2		
15	CH_2	2,20, 2,13	30,0		
16	CH	4,76	47,2		
17	Cq		119,9	H-16, H-15	
1'	CH	4,42	96,4	H-2', H-5'	H-2, H-4, H-2', H-3, H-5'
2'	CH	2,89	73,8		

(continuación)

Posición	Grupo	Desplazamiento de ^1H	Desplazamiento de ^{13}C	Correlación de HMBC	Correlaciones de NOE
3'	CH	3,15	77,4		
4'	CH	3,18	72,2		
5'	CH	3,41	74,4		
6'	CO		172,6		

Otro compuesto preferido es:

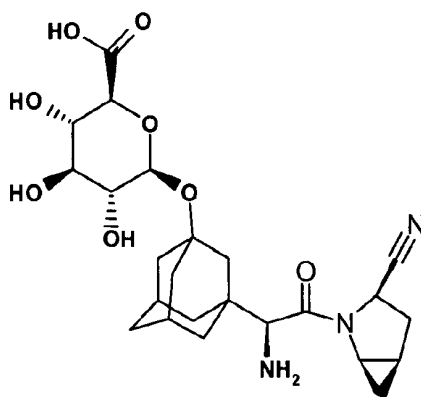


Figura BB

5

En una forma de realización más preferida, el compuesto de la figura BB está en una forma substancialmente pura.

Este compuesto O-glucurónico (Figura BB) se puede obtener adaptando el proceso descrito aquí. El proceso para obtener el compuesto de partida en donde R' es -OH se describe en la Solicitud de Patente WO 01/068603, o WO 05/095339.

- 10 Una sal puede ser la sal HCl. (HCl) = como clorhidrato. Todas las sales HCl de los productos finales se preparan pasando gas de HCl a través de una solución 0,1 Molar de la base libre en tetrahidrofurano hasta que la solución está claramente ácida, seguido por la remoción del solvente (evaporador rotatorio/bomba).

Los materiales de partida de amino-adamantano se conocen en la literatura o pueden se preparados de la sigue manera:

- 15 La fabricación de 3,5-dimetil-1-adamantilamina se describe en J. Med. Chem., 25; 1; 1982; 51 - 56.

La fabricación de 3-etil-1-adamantilamina se describe en J. Med. Chem., 25; 1; 1982; 51 - 56.

3-Metoxi-1-adamantilamina se puede preparar de la siguiente manera:

- 20 A una suspensión agitada enfriada en hielo-agua de hidruro de potasio (0,680 g; 5,95 mmoles) en 15,0 mL de tetrahidrofurano, se le añade gota a gota durante 30 minutos, una mezcla de 1-aminoadamantano-3-ol (1,00 g; 5,95 mmoles) y 15,0 mL de tetrahidrofurano. La mezcla resultante se agita luego durante 30 minutos adicionales, y se le añade después gota a gota durante un minuto, yodometano (0,370 mL; 5,95 mmoles). La reacción resultante de color blanco opaco se agita luego a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluye luego con 50 mL de cloruro de metileno y se filtra para remover las impurezas inorgánicas. El filtrado se concentra entonces y se purifica sobre gel de sílice empleando un aparato SIMS/Biotage y metanol al 19% e hidróxido de amonio al 1% en
- 25 cloruro de metileno como eluyente, para producir 3-metoxi-1-adamantilamina como un aceite opaco.

Síntesis de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano:

- 5 A una mezcla de 1-aminoadamantano-3-ol (5,00 g; 30,0 mmoles) y carbonato de potasio (6,20 g; 45 mmoles) en 150 mL de tetrahidrofurano se le añade gota a gota durante un período de 10 minutos, bencilclorofornato (4,70 g, 33,0 mmoles). La mezcla se agita entonces a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se reparte entre acetato de etilo y agua. El producto se extrae luego en acetato de etilo y la capa acuosa se lava dos veces con acetato de etilo (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan entonces sucesivamente con 100 mL de hidróxido de sodio acuoso 2 N, agua y salmuera, se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran (evaporador rotatorio/bomba) para obtener 1-bencilcarbamoiladamantano-3-ol como un sólido de color blanco con un rendimiento del 85%.
- 10 A una solución clara de 1-bencilcarbamoiladamantano-3-ol (1,00 g; 3,32 mmoles) y tert-butylisocianato (380 µl, 3,32 mmoles) en 30 mL de cloruro de metileno se le añade por medio de una jeringa, cloruro de trimetilsililo (20,0 µl, 0,17 mmoles). Esta reacción se agita luego a temperatura ambiente durante 18 horas, se concentra (evaporador rotatorio) y se purifica sobre gel de sílice empleando un aparato SIMS/Biotage y acetato de etilo al 20% en hexano como eluyente, para producir 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-bencilcarbamoiladamantano como un sólido de color blanco con rendimiento cuantitativo.
- 15 A una mezcla de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-bencilcarbamoiladamantano (1,50 g, 3,75 mmoles) y paladio al 10% sobre carbono (400 mg) en etanol (150 mL) en un matraz de hidrogenación Parr de 1 litro, se le añade hidrógeno (50 psi). Se agita luego esta mezcla de color negro opaco durante 24 horas. La reacción se filtra luego a través de Celite para remover el catalizador de paladio y concentrarla (evaporador rotatorio/bomba) para obtener 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano como un aceite claro con un rendimiento del 99%.
- 20 El procedimiento para la síntesis de 4-[[[(metoxifenil)amino]carbonil]oxi]-1-aminoadamantano es esencialmente el procedimiento de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano excepto porque en el segundo paso en donde un equivalente de 4-metoxifenil isocianato reemplaza al tert-butylisocianato, se usa 1,2-dicloroetano como solvente en vez del cloruro de metileno, y la reacción se agita a 50°C durante 18 horas. Se obtiene la amina final intermedia como un aceite.
- 25 El procedimiento para la síntesis de 3-[[[(fenilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano es esencialmente el procedimiento de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano excepto porque en el segundo paso en donde un equivalente del fenil isocianato reemplaza al tert-butylisocianato, se usa 1,2-dicloroetano como solvente en vez del cloruro de metileno, y la reacción se agita a 50°C durante 18 horas. Se obtiene la amina final intermedia como un aceite claro.
- 30 El procedimiento para elaborar 2-aminoadamantano-5-ol es el mismo que en el Ejemplo 1 excepto porque el material de partida es 2-aminoadamantano en vez de 1-aminoadamantano.
- El procedimiento para la síntesis del 3-acetoxi-1-aminoadamantano nucleofílico es esencialmente el procedimiento de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano excepto por una acilación estándar de 1-bencilcarbamoiladamantano-3-ol utilizando 1,2 equivalentes de cloruro de acetilo, 3,0 eq. de piridina, 0,1 eq. de 4-dimetilaminopiridina y 1,2-dicloroetano que se agitan todos a temperatura ambiente durante 24 horas. Se obtiene la amina final como un aceite denso.
- 35 El procedimiento para la síntesis de 3-[[[(diisopropil)amino]carbonil]oxi]-1-aminoadamantano es esencialmente el procedimiento de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano excepto porque en el segundo paso en donde un equivalente del cloruro de diisopropilcarbamoilo reemplaza al tert-butylisocianato, se usa 1,2-dicloroetano como solvente en vez del cloruro de metileno, y la reacción se agita a 85°C durante 18 horas. Se obtiene la amina final intermedia como un sólido de color gris.
- 40 El procedimiento para la síntesis de 3-[[[(ciloexil)amino]carbonil]oxi]-1-aminoadamantano es esencialmente el procedimiento de 3-[[[(terbutilamino)carbonil]oxi]-1-aminoadamantano excepto porque en el segundo paso en donde un equivalente de ciclohexilisocianato reemplaza al tert-butylisocianato, se usa 1,2-dicloroetano como solvente en vez del cloruro de metileno, y la reacción se agita a 50°C durante 18 horas. Se obtiene la amina final intermedia como un aceite denso claro.
- 45 El procedimiento para elaborar 3-etoxi-1-adamantilamina (un aceite claro) es el mismo que para la 3-metoxi-1-adamantilamina excepto porque se utiliza yodoetano (1,3 equivalentes) en vez de yodometano.

Ejemplo de Formulación

- 50 Las tabletas, cada una conteniendo 50 mg del ingrediente activo, NVP-BQS867 se puede preparar de la siguiente manera:

Composición (para 10,000 tabletas)

Ingrediente Activo	500,0 g
Lactosa	500,0 g
Almidón de patata	352,0 g
Gelatina	8,0 g
Talco	60,0 g
Estearato de magnesio	10,0 g
Sílice (altamente dispersa)	20,0 g
Etanol	cantidad suficiente

El ingrediente activo se mezcla con la lactosa y 292 g de almidón de patata, y la mezcla se humedece utilizando una solución alcohólica de la gelatina y se granula por medio de un tamiz. Después del secado, el resto del almidón de patata, el talco, el estearato de magnesio y la sílice altamente dispersa, se mezclan y la mezcla se comprime para producir tabletas de peso 145,0 mg, cada una con un contenido de ingrediente activo de 50,0 mg que, si se desea, pueden tener muescas de corte para un ajuste más fino de la dosis.

5

III. Ejemplo 2: Experimento biológico

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Descripción
AMC	aminometilcumarina
BSA	Albumina de suero bovino
CHAPS	3-((3-colamidopropil)-dimetilamino)-propanosulfonato
DABCYL	Ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico
DMSO	dimetilsulfóxido
DPP-2	dipeptidil peptidasa 2
DPP-8	dipeptidil peptidasa 8
DPP-9	dipeptidil peptidasa 9
DPP-IV	dipeptidil peptidasa IV
EDANS	Ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfónico
FAP	Proteína de activación del fibroblasto, alfa
FI	Intensidad de fluorescencia
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietilil)-1-piperazin-etanosulfónico

(continuación)

Abreviatura	Descripción
P _M ef.	Peso molecular eficiente
Nle	norleucina
NVP-BQS867	NVP-BQS867-NX-2
PEP	prolil-endopeptidasa
HPLC prep.	Cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento
Rh110	rodamina-110
SD	Desviación estándar
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

5 IV. Material y métodos

A. A. Instrumentación

10 Todas las soluciones que contienen proteínas y péptidos fueron manejadas en tubos con silicona (Life Systems Design, Merenschwand, Suiza). Las soluciones del compuesto así como la enzima y las soluciones del sustrato fueron transferidas a placas de 384 pozos (Cliniplate negro; catálogo no. 95040020 Labsystems Oy, Finlandia) por medio de un pipeteador de 96 canales CyBi (CyBio AG, Jena, Alemania).

1. 1. Instrumentación para las mediciones de FI

15 Para las mediciones de la intensidad de fluorescencia (FI) con AMC como colorante, se utilizó un lector Ultra Evolution (TECAN, Maennedorf, Suiza). Se equipó el instrumento con una combinación de un filtro de paso de banda de 350 nm (ancho de banda de 20 nm) y de 500 nm (ancho de banda 25 nm) para adquisición de excitación y de emisión de fluorescencia, respectivamente. Para incrementar la relación de señal: fondo, se empleó un espejo dicróico apropiado. Todos los filtros y los espejo dicróico fueron adquiridos a través de TECAN.

20 Las mediciones de FI utilizando un colorante Rh110 se hicieron con un lector Safire2 de (TECAN, Maennedorf, Suiza). El Safire2 es un instrumento con base en un monocromador y se tomaron longitudes de onda de 485 nm y 535 nm para la adquisición de excitación y emisión de fluorescencia, respectivamente. Los anchos de banda se fijaron en 20 nm tanto en la trayectoria de excitación como de emisión.

Los fluoróforos en cada pozo fueron excitados por medio de tres destellos por medición.

2. Cálculo de los valores IC₅₀ de los datos promediados

25 Los datos de las corridas de los ensayos independientes se promediaron y graficaron utilizando un programa de Origin 7.5SR6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Se utilizó una rutina de regresión no lineal incorporada de Origin para ajustar los datos promediados a la función 'logística'.

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/IC_{50})^p) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde y es el % de inhibición a la concentración del inhibidor, x. A1 es el valor de inhibición más bajo, es decir, 0%, y A2 es el valor de inhibición máximo, es decir 100%. El exponente, p, es el coeficiente de Hill.

B. Determinación de los valores de IC₅₀

30 Para la determinación de los valores de IC₅₀, se realizaron los ensayos a temperatura ambiente en placas de 384

5 pozos. Todos los volúmenes finales de ensayo fueron de 30 µl. Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO/agua al 90% (v/v) y se diluyeron en agua (que contenía CHAPS al 0,05% (p/v)) hasta 3 veces la concentración deseada del ensayo. Para cada ensayo, se añadieron 10 µl de agua/CHAPS (más o menos el compuesto de prueba) por pozo, seguido por 10 µl de solución de proteasa (diluida con amortiguador del ensayo; para la concentración final del ensayo consultar § Condiciones de ensayo). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se inició la reacción por medio de la adición de 10 µl de solución del sustrato (para concentraciones finales § Condiciones de Ensayo). Las once concentraciones finales del compuesto fueron ya sea 0,9 nM, 3 nM, 9 nM, 30 nM, 90 nM, 300 nM, 900 nM, 3 µM, 9 µM, 30 µM y 90 µM o 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM y 300 µM. El efecto del compuesto sobre la actividad enzimática se obtuvo a partir de las curvas de progreso lineal y se determinó a partir de dos lecturas, la primera tomada directamente después de la adición del sustrato (t = 0 min) y la segunda después de 1 hora (t = 60 min). El valor de IC₅₀ se calculó a partir del gráfico de porcentaje de inhibición versus la concentración del inhibidor utilizando un software de análisis de regresión no lineal (XLfit, Versión 4.0; ID Business Solution Ltd., Guildford, Surrey, RU).

C. Condiciones de Ensayo

15 Todas las condiciones con respecto a la enzima, el sustrato y el amortiguador se enlistan a continuación para los ensayos individuales.

1. -DPP-2 (dipeptidil peptidasa 2)

enzima: DPP-2 humana que cubre los aminoácidos 30 - 492; expresada y purificada a partir de células de insecto (sistema de expresión de baculovirus)

20 sustrato: Nle-Pro-AMC, adquirido a través de Biosyntan (www.biosyntan.de), número de producto 4572

concentración de la enzima: 0,03 nM

concentración del sustrato: 2 µM

amortiguador del ensayo: citrato de sodio 100 mM, pH 5,5, CHAPS al 0,05% (p/v)

2. -DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV)

25 enzima: DPP-IV humana que cubre los aminoácidos 39 - 766; expresada y purificada a partir de células de insecto (sistema de expresión de baculovirus)

sustrato: Gly-Pro-AMC, adquirido a través de Bachem (www.bachem.com), número de catálogo I-1225

concentración de la enzima: 0,01 nM

concentración del sustrato: 10 µM

30 amortiguador del ensayo: Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 10 mM, CHAPS al 0,05% (p/v)

3. DPP-IV de plasma humano (dipeptidil peptidasa IV endógena en plasma sanguíneo humano)

enzima: DPP-IV humana endógena de una muestra de plasma, donantes machos

sustrato: (H-Ala-Proh-Rh110, en síntesis casera)

concentración de la enzima: aproximadamente 5 nM

35 concentración del sustrato: 10 µM

solución de ensayo: plasma sanguíneo humano, diluido hasta un contenido de plasma del 50% con amortiguador (Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 10 mM, CHAPS al 0,05% (p/v))

4. -DPP-8 (dipeptidil-peptidasa 8)

40 enzima: DPP-8 humana que cubre los aminoácidos 1 - 882; expresada y purificada a partir de células de insecto (sistema de expresión de baculovirus)

substrato: Gly-Pro-AMC, adquirido a través de Bachem (www.bachem.com), número de catálogo I-1225

concentración de la enzima: 0,05 nM

concentración del substrato: 10 μ M

amortiguador de ensayo: Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 10 mM, CHAPS al 0,05% (p/v)

5 5. -DPP-9 (dipeptidil-peptidasa 9)

enzima: DPP-9 humana que cubre los aminoácidos 1 - 863; expresada y purificada a partir de *Pichia pastoris*

substrato: Gly-Pro-AMC, adquirido en Bachem (www.bachem.com), número de catálogo I-1225

concentración dela enzima: 1 nM

concentración del substrato: 10 μ M

10 amortiguador de ensayo: Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 10 mM, CHAPS al 0,05% (p/v)

6. -FAP (proteína de activación de fibroblasto, alfa)

enzima: FAP α humana que cubre los aminoácidos 27 - 760 excluyendo los dominios citoplasmático y transmembrana, expresada y purificada a partir de células de insectos (sistema de expresión de baculovirus)

substrato: Z-Gly-Pro-AMC, comprada en Bachem (www.bachem.com), número de catálogo I-1145

15 concentración dela enzima: 0,1 nM

concentración del substrato: 8 μ M

amortiguador de ensayo: Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS al 0,05% (p/v)

7. -PEP (prolil-endorpeptidasa)

enzima: PEP humana que cubre los aminoácidos 1 - 710; expresada y purificada a partir de *Pichia pastoris*

20 substrato: Z-Gly-Pro-AMC, adquirido a través de Bachem (www.bachem.com), número de catálogo I-1145

concentraciones de la enzima: 0,03 nM

concentración del substrato: 10 μ M

amortiguador de ensayo: Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS al 0,05% (p/v), BSA al 0,1% (p/v).

25 V. D. Resultados

Los resultados de todas las mediciones de IC₅₀ para el compuesto NVP-BQS867 se resumen en las Tablas 3-1 a 3-7 siguientes. Para hDPP-IV, DPP-IV endógeno en el pasma sanguíneo humano, hDPP-8, hDPP-9, hFAP y hPEP.

(a) Tabla V-1 potencia de NVP-BQS867-NX-2 sobre DPP-2 humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	> 300	-	> 90
2	> 300	-	
3	> 90	-	
4	> 90	-	

(b) Tabla V-2 Potencia del NVP-BQS867-NX-2 sobre DPP-IV humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	0,004	0,7	0,006 ± 0,001
2	0,006	0,9	
3	0,007	1,3	
4	0,005	1,1	

5

(c) Tabla V-3 Potencia de NVP-BQS867-NX-2 en plasma DPRIV humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	0,003	1,4	0,004 ± 0,001
2	0,004	1,4	
3	0,004	1,2	
4	0,004	1,2	

(d) Tabla V-4 Potencia de NVP-BQS867-NX-2 sobre DPP-8 humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	8,3	1,2	8,0 ± 0,3
2	8,0	1,3	
3	8,1	1,2	
4	7,6	1,2	

(e) Tabla V-5 Potencia de NVP-BQS867-NX-2 en DPP-9 humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	0,7	1,0	0,5 ± 0,2
2	0,4	0,9	
3	0,6	1,0	
4	0,4	0,9	

(f) Tabla V-6 Potencia de NVP-BQS867-NX-2 sobre FAP humana.

Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	43	1,3	24 ± 13
2	16	0,8	
3	19	0,7	
4	19	0,8	

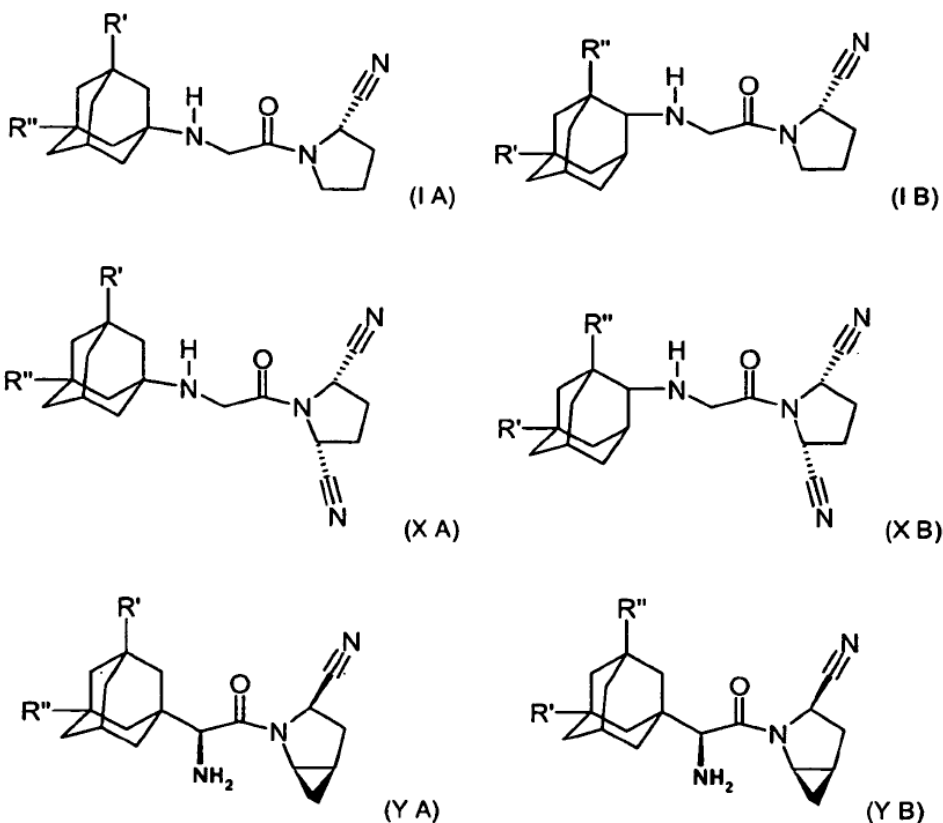
5

(g) Tabla V-7 Potencia de NVP-BQS867-NX-2 sobre PEP humana.

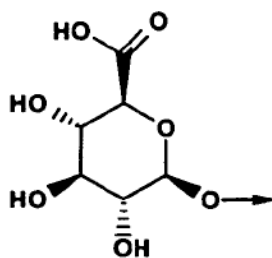
Experimento	Valor de IC ₅₀ [μM]	Coeficiente de Hill	Valor promedio de IC ₅₀ ± SD [μM]
1	52	0,7	25 ± 18
2	15	1,2	
3	18	0,8	
4	14	0,6	

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B)



en donde R' representa



5

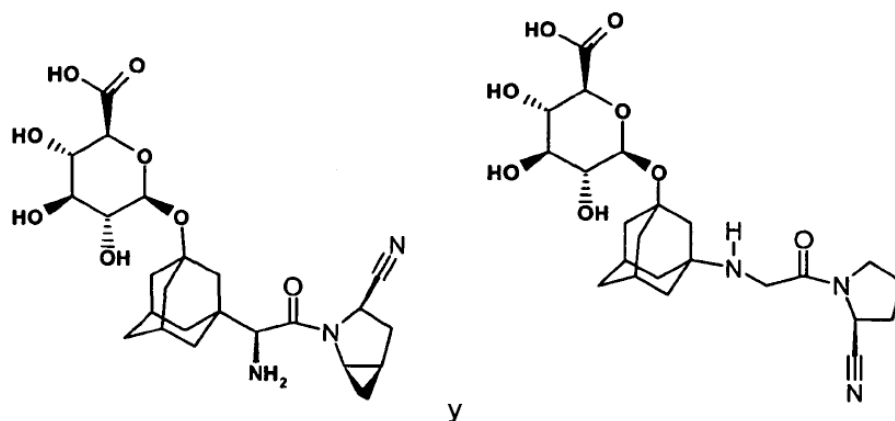
en donde R'' representa hidrógeno, hidroxí, alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono, alcanoioli de 1 a 8 átomos de carbono, o $R_5R_4N-CO-O-$, en donde R_4 y R_5 son independientemente alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o fenilo que está sustituido o no sustituido por un sustituyente seleccionado de entre alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono, halógeno y trifluorometilo y en donde R_4 adicionalmente es hidrógeno; o R_4 y R_5 juntos representan alqueno de 3 a 6 átomos de carbono;

10

en forma libre o en forma de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable.

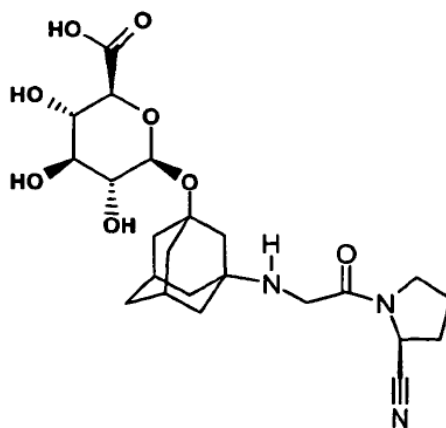
2. Un compuesto de las fórmulas (I A), (I B), (X A), (X B), (Y A) o (Y B) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R'' representa hidrógeno.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado de entre el grupo que consiste de:



o, en cada caso, una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable de los mismos.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma libre o en forma de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable, junto con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 6. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV en un mamífero que requiera de la misma aplicando una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 7. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV en un mamífero que requiera de la misma aplicando una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica acuerdo con la reivindicación 5.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el medicamento se utiliza para tratar condiciones mediadas por la inhibición de dipeptidil peptidasa-IV.

20 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la condición tratada es diabetes mellitus que no depende de insulina.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de condiciones mediadas por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la condición tratada es diabetes mellitus que no dependiente de insulina.

12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de condiciones mediadas por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV.

13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 en donde la condición tratada es diabetes mellitus que no dependiente de insulina.