

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 806**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10780026 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2436684**

54 Título: **Salas de (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxilato de metilo**

30 Prioridad:

27.05.2009 CN 200910145237

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

18.05.2015

73 Titular/es:

**JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (100.0%)
No. 145 Renmin East Road Xinpu District
Lianyungang, Jiangsu 222002, CN**

72 Inventor/es:

**YUAN, KAIHONG;
MA, SHUQIN;
ZHU, LIN y
LIU, HUAWEN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 535 806 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

Sales de (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxilato de metilo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxilato de metilo y a procedimientos de preparación de las mismas, así como a su utilización para la preparación de medicamentos antidiabéticos.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los datos de la OMS pusieron de manifiesto que la tasa de morbilidad, la tasa de discapacidad y la tasa de mortalidad para la diabetes mellitus, así como el nivel de salud general de los pacientes que padecen dicha afección, había alcanzado ya el tercer lugar entre las enfermedades no infecciosas; la diabetes, los tumores y las enfermedades cardiovasculares eran las tres principales enfermedades que ponían en peligro la salud humana. La diabetes mellitus suele clasificarse en diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2; existen más de 240 millones de pacientes con diabetes, y el 90% de los mismos padecen la diabetes de tipo 2, que además presenta una tasa de crecimiento anual del 1%, de modo que la diabetes de tipo 2 será el nuevo punto principal de crecimiento del mercado de los fármacos antidiabéticos. La incidencia de la diabetes en China es aproximadamente del 5%, con un número de pacientes que ocupa el segundo lugar en el mundo, por detrás de la India. En el mercado existen muchos fármacos antidiabéticos: la inyección de insulina, la metformina, la rosiglitazona o la pioglitazona son ejemplos de los mismos. Sin embargo, no existe ningún fármaco que por sí solo pueda mantener a largo plazo el nivel de HbA1c de los pacientes de diabetes de tipo 2 dentro del intervalo deseado. Aunque se utilicen combinados, el efecto de los fármacos descenderá año tras año a partir de los 3-4 años. Las reacciones adversas son uno de los problemas de muchos fármacos hipoglucemiantes, siendo la hipoglucemia grave el mayor motivo de preocupación de los médicos; en segundo lugar, muchos fármacos hipoglucemiantes orales, tales como las sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa y las tiazolidinadionas pueden inducir un aumento de peso en los pacientes, y algunos de ellos pueden inducir además enfermedades cardiovasculares.

Por consiguiente, el desarrollo de nuevos tipos de fármacos hipoglucemiantes con un nuevo mecanismo de acción y con una mayor seguridad y eficacia es un importante objetivo que los científicos deberían alcanzar rápidamente.

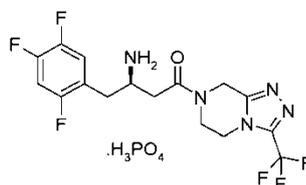
35 En el proceso de constante búsqueda de nuevos métodos, se descubrió que las hormonas endocrinas desempeñan un papel importante en la patología y la fisiología de la diabetes de tipo 2. La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una enzima importante relacionada con la diabetes, por lo que inhibir su acción para tratar la diabetes de tipo 2 constituye un nuevo método con buenas perspectivas. Los inhibidores de la DPP-IV pueden estimular indirectamente la secreción de insulina, cuya acción se genera por inhibición de la DPP-IV a fin de estabilizar las hormonas endocrinas, tales como las hormonas incretinas, el péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP).

45 El GLP-1 es una hormona expresada por el protogén del glucagón tras la ingesta de comida y secretada principalmente por las células L de la mucosa intestinal, y puede estimular la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, desempeñando un papel significativo en la estabilidad del nivel de azúcar en la sangre. Los experimentos demuestran que el GLP-1 tiene las siguientes funciones fisiológicas: actuar sobre las células β pancreáticas de un modo dependiente de la glucosa, facilitar la transcripción de los genes de la insulina, aumentar la biosíntesis y la secreción de la insulina, estimular la proliferación y diferenciación de las células β , inhibir la apoptosis de las células β a fin de aumentar el número de células β pancreáticas; inhibir la secreción de glucagón; inhibir el apetito y la ingesta de alimentos; retrasar el vaciado del contenido gástrico, etc. Todas estas funciones son útiles para reducir el nivel de azúcar en la sangre tras la ingesta de alimentos y mantenerlo a un valor constante. Además, no se presenta el peligro de una hipoglucemia grave. El GLP-1 controla bien el nivel de azúcar en la sangre de los modelos animales y de los pacientes de diabetes de tipo 2 por múltiples mecanismos. Sin embargo, el puede perder actividad biológica a través de la degradación rápida por la DPP-IV, y su semivida es menor de 2 minutos, lo que limita completamente su uso clínico. En las investigaciones se ha descubierto que los inhibidores de la DPP-IV pueden proteger totalmente el GLP-1 endógeno e incluso el exógeno de la inactivación por la DPP-IV, aumentar el nivel de GLP-1 activado y reducir el efecto antagonista de los metabolitos de GLP-1. Además, los inhibidores de la DPP-IV también pueden retrasar la incidencia de la diabetes a través de la estimulación de la regeneración de las células β pancreáticas y mejorando la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

60 Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) representan una nueva clase de agentes que se están desarrollando para el tratamiento o la mejora del control glucémico en pacientes con diabetes de tipo 2. Para textos sobre la aplicación de los inhibidores de la DPP-IV en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, se hace referencia a las siguientes publicaciones: (1) H.-U. Demuth, y otros, "Type 2 diabetes-Therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors", Biochim. Biophys. Acta. 1751:33-44 (2005) y (2) K. Augustyns y otros, "Inhibitors of proline-specific dipeptidyl peptidases: DPP4 inhibitors as a novel approach for the treatment of Type 2 diabetes", Expert Opin. Ther. Patents,

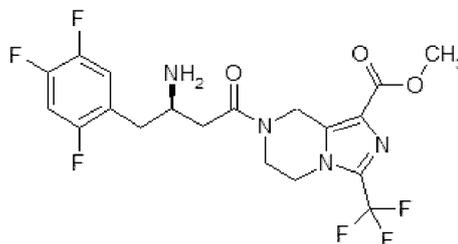
15:1387-1407 (2005).

En la actualidad, se han dado a conocer algunos inhibidores de la DPP-IV (US5462928, US5543396, WO9515309, WO2003004498, WO2003082817, WO2004032836, WO2004085661), entre ellos el MK-0431 como inhibidor de la DPP-IV, de Merck, que ha mostrado una buena actividad de inhibición y selectividad, y que está disponible en el mercado desde 2006.



MK-431

10 El éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico con la siguiente fórmula es el compuesto A, cuyo código es SP2086.



15 Compuesto A (SP2086)

Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables del compuesto A y a procedimientos de preparación de las mismas, y preferentemente se refiere a las ventajas del fosfato del compuesto A en comparación con otras sales en cuanto a estabilidad, actividad antidiabética y características farmacocinéticas.

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico, en las que dichas sales se seleccionan dentro del grupo de sales inorgánicas que comprende la sal de bromhidrato, la sal de sulfato, la sal de nitrato o la sal de fosfato, preferentemente la sal de sulfato o la sal de fosfato, todavía más preferentemente la sal de fosfato; y sales orgánicas seleccionadas dentro del grupo que comprende la sal de mesilato, la sal de maleato, la sal de tartrato, la sal de succinato, la sal de acetato, la sal de trifluoroacetato, la sal de fumarato, la sal de citrato, la sal de bencenosulfonato, la sal de benzoato, la sal de naftalenosulfonato, la sal de lactato o la sal de malato, preferentemente la sal de malato, la sal de mesilato o la sal de maleato. Una sal farmacéuticamente aceptable particularmente preferida es la sal de fosfato, que es más ventajosa que otras sales en términos de estabilidad, actividad antidiabética y características farmacocinéticas. Otro aspecto de la presente invención se refiere a los procedimientos de preparación de las sales farmacéuticamente aceptables del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico, que se pueden preparar según los métodos de salificación convencionales en la técnica.

35 La presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal farmacéuticamente aceptable del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico y vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 La presente invención también se refiere a la utilización de sales farmacéuticamente aceptables del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico y de las composiciones farmacéuticas de las mismas en la preparación de fármacos antidiabéticos.

45 La sal de clorhidrato y la sal de fosfato del compuesto A son superiores al propio compuesto A y a las otras sales en términos de estabilidad, actividad antidiabética y características farmacocinéticas.

Procedimiento de síntesis del material crítico SM2086-15 en la presente invención

50 El procedimiento de síntesis del éster metílico del ácido (R)-7-[3-t-butoxicarbonilamino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-

3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico se refiere al procedimiento de preparación descrito en el ejemplo 1 del documento PCT/CN2008/001936.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo de referencia 1. Preparación del clorhidrato del compuesto A (SP2086-HCL)

Se introdujo éster metílico del ácido (R)-7-[3-t-butoxicarbonilamino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SM2086-15) (1,35 kg, 2,40 mol), HCL-acetato de etilo (mayor de 2 M) (12,3 kg) en un recipiente de reacción de 100 l y se agitó hasta disolución. La mezcla se hizo reaccionar durante más de 2 horas a temperatura normal. Se detectó por cromatografía de capa fina (TLC) la compleción de la reacción antes de evaporar y bombear a sequedad con bomba de aceite, obteniéndose 1,15 ~ 1,20 kg de producto sólido de color blanco a amarillo claro con $[\alpha]_D^{20}$ -28,0 ~ -33,0° (C = 1, metanol), que se agitó hasta disolución. La mezcla se hizo reaccionar durante más de 2 horas a temperatura normal. Se detectó por cromatografía de capa fina la compleción de la reacción antes de evaporar y bombear a sequedad con bomba de aceite, obteniéndose 1,15 ~ 1,20 kg de producto sólido de color blanco a amarillo claro con $[\alpha]_D^{20}$ -28,0 ~ -33,0° (C = 1, metanol), con un rendimiento del 96,0% ~ 100%. El producto era clorhidrato del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SP2086-HCL). (Detección por TLC: placa de gel de sílice GF₂₅₄; reactivo de revelado: cloroformo:metanol:amoníaco = 40:1:0,1; materia prima 15: Rf = 0,80, producto 1: Rf = 0,50; visualización ultravioleta).

Ejemplo 2. Preparación del fosfato del compuesto A (SP2086-H₃PO₄)

Se introdujo el SP2086-HCL (1,20 kg, 2,40 mol) en un recipiente de reacción de 100 l y se disolvió en diclorometano (15,2 kg); a continuación se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (5,8 kg). La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano (6,0 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua (5 kg), y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,12 kg de aceite. Dicho aceite se agitó y se disolvió en una cantidad 30 veces mayor de isopropanol (26,0 kg). Se añadió una solución al 85% de ácido fosfórico (305,2 g, 2,65 mol) en isopropanol (1,22 kg) inmediatamente después de que el aceite se disolviera completamente. El sólido se separó, se filtró tras agitar durante 2 horas y se lavó con isopropanol frío. El producto húmedo se secó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,16 ~ 1,24 kg de un sólido de color blanco a amarillo claro con un rendimiento del 86,0% ~ 92,0% (el producto húmedo se pudo suspender directamente en isopropanol sin secado).

Ejemplo 3. Preparación del mesilato del compuesto A

Se introdujo clorhidrato del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SP2086-HCL) (1,20 kg, 2,40 mol) en un recipiente de reacción de 100 l y se disolvió en diclorometano (15,2 kg); a continuación se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (5,8 kg). La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano (6,0 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua (5 kg), y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,12 kg de aceite. Dicho aceite se agitó y se disolvió en una cantidad 30 veces mayor de isopropanol (26,0 kg). Se añadió una solución de ácido metanosulfónico (254,7 g, 2,65 mol) en isopropanol (1,22 kg) inmediatamente después de que el aceite se disolviera completamente. El sólido se separó, se filtró tras agitar durante 2 horas y se lavó con isopropanol frío. El producto húmedo se secó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,08 ~ 1,21 kg de sólido de color blanco a amarillo claro con un rendimiento del 79,5% ~ 89,3%.

Ejemplo 4. Preparación del sulfato del compuesto A

Se introdujo clorhidrato del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SP2086-HCL) (1,20 kg, 2,40 mol) en un recipiente de reacción de 100 l y se disolvió en diclorometano (15,2 kg); a continuación se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (5,8 kg). La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano (6,0 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua (5 kg), y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,12 kg de aceite. Dicho aceite se agitó y se disolvió en una cantidad 30 veces mayor de isopropanol (26,0 kg). Se añadió una solución al 98% de ácido sulfúrico (265,0 g, 2,65 mol) en isopropanol (1,22 kg) inmediatamente después de que el aceite se disolviera completamente. El sólido se separó, se filtró tras agitar durante 2 horas y se lavó con isopropanol frío. El producto húmedo se secó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,14 ~ 1,25 kg de una sustancia sólida de color blanco a amarillo claro con un rendimiento del 85,5% ~ 93,0% (el producto húmedo se pudo suspender directamente en isopropanol sin secado).

Ejemplo 5. Preparación del malato del compuesto A

Se introdujo clorhidrato del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SP2086-HCL) (1,20 kg, 2,40 mol) en un recipiente de reacción

de 100 l y se disolvió en diclorometano (15,2 kg); a continuación se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (5,8 kg). La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano (6,0 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua (5 kg), y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,12 kg de aceite. Dicho aceite se agitó y se disolvió en una cantidad 30 veces mayor de isopropanol (26,0 kg). Se añadió una solución de ácido L-málico (355,34 g, 2,65 mol) en isopropanol (1,22 kg) inmediatamente después de que el aceite se disolviera completamente. El sólido se separó, se filtró tras agitar durante 2 horas y se lavó con isopropanol frío. El producto húmedo se secó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,19 ~ 1,32 kg de una sustancia sólida de color blanco a amarillo claro con un rendimiento del 87,5% ~ 92,0% (el producto húmedo se pudo suspender directamente en isopropanol sin secado).

Ejemplo 6. Preparación del maleato del compuesto A

Se introdujo clorhidrato del éster metílico del ácido (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico (SP2086-HCL) (1,20 kg, 2,40 mol) en un recipiente de reacción de 100 l y se disolvió en diclorometano (15,2 kg); a continuación se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (5,8 kg). La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano (6,0 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua (5 kg), y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,12 kg de aceite. Dicho aceite se agitó y se disolvió en una cantidad 30 veces mayor de isopropanol (26,0 kg). Se añadió una solución de ácido maleico (307,59 g, 2,65 mol) en isopropanol (1,22 kg) inmediatamente después de que el aceite se disolviera completamente. El sólido se separó, se filtró tras agitar durante 2 horas y se lavó con isopropanol frío. El producto húmedo se secó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 1,19 ~ 1,32 kg de una sustancia sólida de color blanco a amarillo claro con un rendimiento del 87,5% ~ 92,0% (el producto húmedo se pudo suspender directamente en isopropanol sin secado).

Ejemplo 7: estabilidad del compuesto A y sus sales

(1) Método de determinación del contenido

Con un sílice químicamente unido a octadecilsilano como incrementador del volumen y una solución acuosa al 0,1% de amoniaco-acetonitrilo (65:35) como fase móvil, se eluyó en modo de gradiente a una longitud de onda de detección de 230 nm. Se tomó una cantidad apropiada de muestra y de solución de referencia, y a continuación se añadió agua para la dilución, formándose soluciones cada 1 ml con 0,2 mg de las mismas, respectivamente. Se tomaron respectivamente 10 µl de la solución de muestra y de la solución de referencia, y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. Se registró el cromatograma y se calculó a través del área de pico, según el método del patrón externo.

tiempo (min)	amoniaco acuoso al 0,1% (%)	acetonitrilo (%)
0	65	35
25	45	35
35	45	35

(2) Resultados de la determinación

La estabilidad de los diferentes tipos de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto A en diferentes condiciones

(Pureza de la materia prima: 98,6%, utilizando HPLC para determinar su contenido)

Nombre Condi- ciones	Compuesto A	Clorhidrato	Mesilato	Sulfato	Fosfato	Malato	Maleato
10 días Luz	95,2%	98,1%	97,6%	97,6%	98,6%	95,7%	94,2%
40°C 10 días	95,2%	98,7%	96,7%	96,6%	98,7%	96,8%	94,2%
60°C 10 días	95,7%	98,2%	96,5%	97,7%	98,5%	96,5%	96,2%
RH75% Seis meses 40°C	92,2%	97,7%	95,4%	96,2%	98,3%	97,2%	93,8%
RH60% Nueve meses 25°C	93,3%	97,5%	95,6%	96,7%	98,6%	94,9%	94,6%

Conclusión: Los resultados de las pruebas de estabilidad pusieron de manifiesto que el clorhidrato y el fosfato del

compuesto A son las sales más satisfactorias, y en particular la estabilidad del fosfato y la estabilidad de las dos sales mencionadas anteriormente son mejores que las del propio compuesto A.

Ejemplo 8: Estudio de actividades biológicas relacionadas de las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto A

Ejemplo de ensayo 1: Compuesto A, MK-0431, estudio de actividad *in vitro* y selectividad

Procedimiento: Se descongeló DPP4-Glo y se tamponó y equilibró a temperatura ambiente, y el agente de ensayo de fluoresceína crioconservado se tamponó antes de su utilización. Se suspendió DPP4-Glo en sustrato y se añadió agua ultrapura; la mezcla se agitó ligeramente hasta uniformidad a fin de proporcionar 1 mM de sustrato. El agente de ensayo de fluoresceína se puso en una botella ámbar y se añadió DPP4-Glo. El agente de ensayo de fluoresceína debe disolverse en 1 min. El compuesto de ensayo se disolvió con DMSO hasta 50 veces la concentración de procesamiento final. Se introdujeron 2 µl de compuesto de ensayo con una concentración de 50 veces a cada tubo de ensayo, y se añadieron 2 µl de DMSO al control negativo y al blanco. Se introdujeron 46 µl de solución tampón Tris a cada tubo de ensayo y se añadieron 48 µl de tampón Tris al blanco. Se introdujeron 2 µl de la enzima DPP4 a cada tubo de ensayo de control negativo y de muestra de ensayo, y los tubos de ensayo se agitaron, se mezclaron y a continuación se centrifugaron. Todas las sustancias presentes en los tubos de ensayo se transfirieron a una placa de 96 pocillos, y los sustratos y el DPP4-Glo se mezclaron en una proporción de 1:49. La mezcla se agitó y se mezcló adecuadamente. Se añadieron 50 µl de la mezcla de DPP4-Glo y sustrato a cada placa de 96 pocillos tras reposar durante 30-60 minutos a temperatura ambiente; la placa se selló con película. Las sustancias presentes en los 96 pocillos se mezclaron lentamente con un oscilador de placa a 300-500 rpm/30 s. Tras un cultivo de entre 30 minutos y 3 horas a temperatura ambiente, el valor de quimioluminiscencia se midió con un lector de microplacas multifunción NOVOstar.

[Tabla 1]

Compuestos de ensayo	DPP4	DPP8		DPP9	
	IC50(M)	IC50(M)	Relación de selectividad (DPP8/DPP4)	IC50(M)	Relación de selectividad (DPP9/DPP4)
Compuesto A	0,008	26,1	3.263	75,5	9.438
MK-0431	0,019	25,8	1.358	92,7	4.879

Resultados: La actividad de inhibición sobre la DPP4 del compuesto A es más fuerte que la del fármaco de control MK-0431, y su selectividad también es mayor que la de MK-0431. Los valores mayores de DPP8/DPPIV y DPP9/DPPIV significan mejor actividad.

Ejemplo de ensayo 2: Efectos de las 6 sales del compuesto A en ratas Wistar genéticamente obesas con diabetes.

Se dividieron algunas ratas Wistar macho obesas con una edad de entre 14 y 19 semanas en cinco grupos, cada uno de ellos compuesto por entre 5 y 6 miembros, y se les administraron respectivamente las 6 sales de compuesto A (en cada caso 10 mg/kg de peso/día, por vía oral), que se mezclaron en su alimento comercial en una proporción de 5 ppm durante 14 días. Se les extrajo sangre de la vena caudal y se utilizó un kit comercial (NC-ROPET, Nippon Chemiphar Co.) para medir la glucosa y la hemoglobina A1 plasmáticas por un método enzimático. Los resultados, que se muestran en la tabla 2, se expresaron como valor medio de cada grupo (n = 5) ± desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de Dunnett. Se utilizó un nivel de significación del 1%.

[Tabla 2]

	Glucosa plasmática	Hemoglobina
Grupo de control	352 ± 32	5,9 ± 0,5
Fosfato del compuesto A	158 ± 24*	4,3 ± 0,6*
Sulfato del compuesto A	327 ± 46	5,4 ± 0,6
Clorhidrato del compuesto A	165 ± 13*	4,5 ± 0,5*
Maleato del compuesto A	294 ± 51*	5,3 ± 0,3
Malato del compuesto A	295 ± 42	5,2 ± 0,6
Mesilato del compuesto A	287 ± 34	5,8 ± 0,4

*: En comparación con el grupo control, p < 0,01

En la tabla 2, el clorhidrato y el fosfato del compuesto A reducen la concentración de glucosa y hemoglobina en sangre de forma evidente, siendo más potentes que las demás sales. La sal más preferida fue el fosfato.

Ejemplo de ensayo 3: Estudio de la tolerancia a la glucosa para diversas sales del compuesto A en ratas Wistar genéticamente obesas con diabetes.

Se dividieron algunas ratas macho obesas con una edad de 13 ~ 14 semanas en cinco grupos, cada uno de ellos compuesto por cinco miembros. Se les administró, respectivamente, las 6 sales del compuesto A (en cada caso 30 mg/kg/día, por vía oral) durante 7 días. Tras someterlas a ayuno durante la noche, se les practicaron inmediatamente pruebas de tolerancia oral a la glucosa (2 g de glucosa/kg/5 ml, por vía oral). Antes de la prueba de tolerancia a la glucosa y después de 120 y 240 minutos de la misma se extrajo sangre de la vena caudal y se analizó la glucosa plasmática por un método enzimático (Encore Chemical System; Baker). Los resultados, que se muestran en la tabla 3, se expresaron como valor medio de cada grupo (n = 5-6) ± desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de Dunnett.

[Tabla 3]

	Glucosa plasmática (mg/dl)		
	0 min	120 min	240 min
Grupo de control	121 ± 8	243 ± 60	139 ± 20
Fosfato del compuesto A	107 ± 3	95 ± 10*	68 ± 5*
Sulfato del compuesto A	120 ± 12	224 ± 62	117 ± 21
Clorhidrato del compuesto A	109 ± 5	116 ± 7*	106 ± 3*
Maleato del compuesto A	103 ± 11	137 ± 17*	102 ± 9*
Malato del compuesto A	110 ± 9	114 ± 12*	95 ± 6*
Mesilato del compuesto A	108 ± 8	115 ± 9*	92 ± 7*

* En comparación con el grupo control, p < 0,01

La tabla 3 indicaba claramente que el clorhidrato y el fosfato del compuesto A inhibían significativamente el aumento del nivel de azúcar en la sangre tras las pruebas de tolerancia a la glucosa, siendo más potentes que las demás sales. El fosfato del compuesto A es particularmente preferido.

Ejemplo de ensayo 4: Pruebas de absorción de diferentes sales del compuesto A en ratasRégimen de dosificación:

Se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos 16 ratas macho sanas con un peso de 200 ~ 220 g. Se administraron a través de una sonda 6,0 mg/kg (con respecto a la base) de sal de fosfato (A), sal de clorhidrato (B), sal de maleato (C), sal de metanosulfonato (D) del compuesto A (volumen de administración de 10 ml/kg, respectivamente, en forma de 0,60 mg/ml (con respecto a la base) de suspensión preparada con un 0,5% de CMC-Na), sometiendo a ayuno desde 12 horas antes de la administración y permitiendo libremente la ingesta de agua. Se extrajeron respectivamente 0,3 ml de sangre venosa a través del plexo venoso postocular de las ratas antes de la administración y tras 0,167, 0,333, 0,50, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0 y 12 horas a partir de la misma; la sangre se introdujo en tubos heparinizados, que se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 min. El plasma se separó y se conservó para el ensayo a -20°C. La concentración sanguínea se determinó por HPLC-espectrometría de masas en tándem.

Promedio de parámetros farmacocinéticos tras la administración por sonda a las ratas de 6,0 mg/kg de diferentes sales del compuesto A.

Preparación	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (ng·h/ml)	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	MRT (h)	CL/F (ml/min/kg)
A	1,54	242	0,50	409	425	1,96	545
B	1,07	148	0,63	317	319	1,86	348
C	0,75	231	0,50	306	307	1,24	326
D	0,87	133	0,88	274	275	1,61	397

Conclusion: El mejor perfil farmacocinético fue el del fosfato del compuesto A.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sales farmacéuticamente aceptables del éster metílico de (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico, en las que dichas sales se seleccionan de entre el grupo que consiste en sal de fosfato, sal de sulfato, sal de nitrato, sal de bromhidrato, sal de mesilato, sal de maleato, sal de tartrato, sal de succinato, sal de acetato, sal de trifluoroacetato, sal de fumarato, sal de citrato, sal de bencenosulfonato, sal de benzoato, sal de naftalenosulfonato, sal de lactato y sal de malato.
- 10 2. Sales según la reivindicación 1, en las que dichas sales se seleccionan de entre el grupo que consiste en sal de sulfato o sal de fosfato.
3. Sal según la reivindicación 2, en la que dicha sal es la sal de fosfato.
- 15 4. Sales según la reivindicación 1, en las que dichas sales se seleccionan de entre el grupo que consiste en sal de malato, sal de mesilato o sal de maleato.
- 20 5. Procedimiento para la preparación de sales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la salificación del éster metílico de (R)-7-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butiril]-3-trifluorometil-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pirazin-1-carboxílico con el ácido correspondiente.
6. Utilización de sales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la preparación de medicamentos para el tratamiento de la diabetes.
- 25 7. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de sales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y vehículos farmacéuticamente aceptables.
8. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 7 en la preparación de medicamentos para el tratamiento de la diabetes.