



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 857**

51 Int. Cl.:
C07D 403/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05733750 .3**

96 Fecha de presentación : **29.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1753748**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2007**

54 Título: **Derivados de prolina y su uso como inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-IV.**

30 Prioridad: **12.05.2004 US 570300 P**
21.03.2005 US 664305 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2009

73 Titular/es: **Pfizer Products Inc.**
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US

72 Inventor/es: **Hulin, Bernard y**
Piotrowski, David, Walter

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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 prolina y su uso como inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-IV

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a inhibidores selectivos de la enzima dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV), composiciones farmacéuticas de la misma, y usos de la misma para tratar las enfermedades y afecciones asociadas con proteínas que están sujetas a procesamiento mediante DPP-IV.

10 **Antecedentes de la invención**

DPP-IV (EC 3.4.14.5) es una serina proteasa que hidroliza preferencialmente un dipéptido N-terminal a partir de proteínas que tienen prolina o alanina en la posición 2. Se cree que DPP-IV está implicada en diabetes, tolerancia a glucosa, obesidad, regulación del apetito, lipidemia, osteoporosis, metabolismo de neuropéptidos y activación de células T, entre otras. De acuerdo con ello, la administración de inhibidores de DPP-IV *in vivo* previene la degradación N-terminal de péptidos sustrato, dando como resultado de este modo concentraciones de circulación más grandes de tales péptidos, y beneficios terapéuticos asociados con tales concentraciones elevadas.

Se ha implicado a DPP-IV en el control de la homeostasis de glucosa porque sus sustratos incluyen los péptidos incretina péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) y polipéptido inhibitorio gástrico (GIP). La escisión de los aminoácidos N-terminales de estos péptidos los vuelve funcionalmente inactivos. Se ha demostrado que GLP-1 es una terapia antidiabética eficaz en pacientes diabéticos tipo 2 y para reducir el requerimiento de insulina relacionada con la comida en los pacientes diabéticos tipo 1. GLP-1 y/o GIP se cree que regulan la saciedad, lipidemia y osteogénesis. GLP-1 exógeno se ha propuesto como un tratamiento para pacientes que sufren de síndrome coronario agudo, angina de pecho y enfermedad cardíaca isquémica.

La administración de inhibidores de DPP-IV *in vivo* previene degradación N-terminal de GLP-1 y GIP, dando como resultado mayores concentraciones circulantes de estos péptidos, incrementando la secreción de insulina y potenciando la tolerancia a glucosa. Sobre la base de estas observaciones, los inhibidores de DPP-IV se consideran como agentes para el tratamiento de la diabetes tipo 2, una enfermedad en la cual la tolerancia a glucosa está disminuida. Además, el tratamiento con inhibidores de DPP-IV previene la degradación de neuropéptido Y (NPY), un péptido asociado con una variedad de trastornos del sistema nervioso central, y péptido YY el cual se ha relacionado con afecciones gastrointestinales tales como úlceras, enfermedad del intestino irritable, y enfermedad inflamatoria del intestino.

A pesar del descubrimiento temprano de insulina y su subsiguiente uso general en el tratamiento de diabetes, y el descubrimiento posterior y el uso de sulfonilureas (por ejemplo clorpropamida, tolbutamida, acetohexamida, biguanidas (por ejemplo, fenformina), metformina, tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona), y pioglitazona como agentes hipoglucémicos orales, el tratamiento de diabetes sigue siendo menos que satisfactorio.

El uso de insulina, necesario en pacientes diabéticos tipo 1 y aproximadamente en el 10% de los pacientes diabéticos tipo 2 en los cuales los agentes orales hipoglucémicos disponibles actualmente son ineficaces, requiere múltiples dosis diarias, usualmente por autoinyección. La determinación de la dosificación apropiada de insulina necesita estimaciones frecuentes de la concentración de glucosa en orina o sangre. La administración de una dosis excesiva de insulina causa hipoglucemia, con consecuencias que varían de anomalías leves en la glucosa en sangre a coma, o incluso muerte.

El tratamiento de la diabetes tipo 2 comprende usualmente una combinación de dieta, ejercicio, agentes orales, y en los casos más graves, insulina. Sin embargo, los hipoglucémicos clínicamente disponibles pueden tener efectos secundarios que limitan su uso. Una necesidad continua de agentes hipoglucémicos, los cuales pueden tener menos efectos secundarios o tener éxito donde otros fallan, es claramente evidente.

La hiperglucemia pobremente controlada es una causa directa de la multiplicidad de complicaciones (cataratas, neuropatía, nefropatía, retinopatía, cardiomiopatía) que caracterizan a la diabetes tipo 2 avanzada. Además, la diabetes tipo 2 es una enfermedad comórbida que frecuentemente se confunde con hiperlipidemia, aterosclerosis e hipertensión, añadiéndose significativamente a la morbilidad y mortalidad generales atribuibles a esas enfermedades.

La evidencia epidemiológica ha establecido firmemente la hiperlipidemia como un factor de riesgo primario para la enfermedad cardiovascular (CVD) debida a aterosclerosis. La aterosclerosis se reconoce que es una causa líder de muerte en los Estados Unidos y Europa occidental. CVD es especialmente prevalente entre sujetos diabéticos al menos en parte debido a la existencia de múltiples factores de riesgo independientes tales como intolerancia a glucosa, hipertrofia ventricular izquierda e hipertensión en esta población. El tratamiento exitoso de hiperlipidemia en la población general, y en sujetos diabéticos en particular, es por lo tanto de importancia médica excepcional.

La hipertensión (presión sanguínea elevada) es una afección que puede ocurrir en muchos pacientes en los cuales el agente causante o trastorno es desconocido. Tal hipertensión "esencial" se asocia a menudo con trastornos tales como obesidad, diabetes, e hipertrigliceridemia y se sabe que la hipertensión se asocia positivamente con insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal y apoplejía. La hipertensión puede contribuir también al desarrollo de aterosclerosis

y enfermedad coronaria. La hipertensión, conjuntamente con resistencia a insulina e hiperlipidemia, comprende la constelación de síntomas que caracterizan el síndrome metabólico, también conocido como síndrome de resistencia a insulina (IRS) y síndrome X.

5 La obesidad es un factor de riesgo bien conocido y común para el desarrollo de aterosclerosis, hipertensión y diabetes. La incidencia de la obesidad y sus secuelas relativas se incrementa en el mundo. Actualmente, están disponibles pocos agentes farmacológicos que reducen la adiposidad efectivamente y aceptablemente.

10 La osteoporosis es una enfermedad progresiva sistémica caracterizada por baja densidad ósea y deterioro de la microarquitectura de tejido óseo, con un incremento consiguiente en fragilidad ósea y susceptibilidad a fractura. La osteoporosis y las consecuencias de resistencia ósea comprometida son una causa significativa de fragilidad, y de morbilidad y mortalidad incrementadas.

15 La enfermedad cardíaca es un problema de salud principal por todo el mundo. Los infartos de miocardio son una fuente significativa de mortalidad entre aquellos individuos con enfermedad cardíaca. Síndrome coronario agudo significa pacientes que tienen o están en alto riesgo de desarrollar un infarto de miocardio agudo (MI).

Aunque hay terapias disponibles para el tratamiento de diabetes, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión, obesidad, y osteoporosis hay una necesidad continua de terapias alternativas y mejoradas.

20 Diversas indicaciones para inhibidores de DPP-IV se discuten en Augustyns y col., Curr. Medicinal Chem., 6, 311 (1999); Ohnuki, y col., Drugs of the Future, 1999, 24, 665-670 (1999); Villhauer, y col., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 36, 191-200 (2001); Drucker, Expert Opin. Invest. Drugs, 12, 87-100 (2003); y Weideman, y col., Curr. Opin. Invest. Drugs, 4, 412-420 (2003).

25 Los compuestos administrados oralmente que inhiben DPP-IV se han preparado recientemente, tales como aquellos descritos en la solicitud internacional WO 02/14271.

30 Los inhibidores de DPP-IV, tales como aquellos descritos en el documento WO 02/14271, se cree que actúan inhibiendo la degradación de las hormonas naturales, GLP-1 y GIP. Por lo tanto, es importante que una concentración adecuada del inhibidor DPP-IV esté disponible en plasma para inhibir DPP-IV coincidentemente con la secreción de las hormonas GLP-1 y GIP. Para lograr tales concentraciones en plasma, se prefiere que los compuestos inhibidores de DPP-IV mantengan una concentración más alta en plasma a lo largo del tiempo que aquella que se esperaría para otros compuestos inhibidores de DPP-IV, tales como aquellos descritos en el documento WO 02/14271.

35 Por lo tanto, lo que se necesita es un compuesto inhibidor de DPP-IV administrado oralmente que tenga actividad inhibidora de DPP-IV equivalente o mejor y que mantenga una concentración en plasma más elevada a lo largo del tiempo.

40 El documento WO03/00250 describe 3-fluoro pirrolidin y el documento WO2005/019165 describe derivados de lisina fluorinados que son inhibidores de DPP-IV.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un compuesto que es 3,3-difluoropirrolidin-1-il)-((2S,4S)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)metanona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- 50 (a) el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto; y
(b) un transportador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 La presente invención se refiere al compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una afección mediada por la dipeptidilpeptidasa-IV en un mamífero.

60 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para tratar la afección mediada por la dipeptidilpeptidasa-IV en un mamífero.

El compuesto, y la composición farmacéutica, de la presente invención son útiles para el tratamiento de la diabetes, preferiblemente diabetes de tipo 2.

65 El compuesto, y la composición farmacéutica, de la presente invención son también útiles para el tratamiento de las afecciones relacionadas con dipeptidilpeptidasa-IV las cuales incluyen, pero no se limitan a, diabetes de tipo 2; diabetes de tipo 1, tolerancia a glucosa alterada, hiperglucemia, síndrome metabólico (síndrome X y/o síndrome de resistencia a insulina), glucosuria, acidosis metabólica, artritis, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética,

5 retinopatía diabética, cardiomiopatía diabética, obesidad, afecciones exacerbadas por obesidad, hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis, osteoporosis, osteopenia, fragilidad, pérdida de hueso, fractura de hueso, síndrome coronario agudo, estatura corta debida a deficiencia en la hormona del crecimiento, infertilidad debida al síndrome ovárico poliquístico, ansiedad, depresión, insomnio, fatiga crónica, epilepsia, trastornos de la alimentación, dolor crónico, adicción al alcohol, enfermedades asociadas con motilidad intestinal, úlceras, síndrome del intestino irritable, síndrome del intestino inflamatorio; síndrome del intestino corto; y la prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

Descripción detallada

10 Los términos usados para describir la presente invención tienen los siguientes significados en el presente documento.

15 La frase “farmacéuticamente aceptable” indica que el transportador, vehículo, diluyente, excipiente(s), y/o sal designado es generalmente compatible químicamente y/o físicamente con los otros ingredientes que comprende la formulación, y fisiológicamente compatibles con el receptor de los mismos.

20 El contenido en átomos de carbono de los diversos restos que contienen hidrocarburos en el presente documento se puede indicar mediante un sufijo que designa el número máximo y mínimo de átomos de carbono en el resto, por ejemplo, los sufijos alquilo(C_a-C_b) y alquilo C_a-C_b, indican un resto alquilo de número entero de átomos de carbono “a” a número entero de átomos de carbono “b”, inclusive. Así, por ejemplo alquilo(C₁-C₆) y alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo alquilo de uno a seis átomos de carbono inclusive.

25 El término “alquilo” significa una cadena de átomos de carbono lineal o ramificada, en la que el grupo alquilo incorpora opcionalmente uno o más dobles o triples enlaces, o una combinación de enlaces dobles y enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, vinilo, alilo, 2-metilpropenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etinilo, propargilo, y similares.

30 El término “alcoxi” se refiere a cadenas de átomos de carbono alifáticas saturadas, monovalentes, lineales o ramificadas unidas a un átomo de oxígeno que se ancla a una estructura de núcleo. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, *iso*-butoxi, *terc*-butoxi, y similares.

35 El término “cicloalquilo” se refiere a un grupo cicloalquilo saturado monocíclico o bicíclico. Los grupos cicloalquilo se pueden condensar opcionalmente a hidrocarburos aromáticos tales como benceno para formar grupos cicloalquilo condensados, tales como indanilo y similares. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y similares.

El término “halógeno” o “halo” representa átomos y sustituyentes de cloro, bromo, fluoro, y yodo.

40 El término “arilo” designa un grupo hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico, por ejemplo, antraceno, fluoreno, naftilo, fenantreno, fenilo, y similares.

45 El término “arilalquilo” significa un grupo alquilo, como se define anteriormente en este documento, en el que al menos uno de los átomos de hidrógeno del mismo se ha sustituido por un grupo arilo, también como se define anteriormente en este documento. Ejemplos de grupos arilalquilo incluyen, entre otros, grupos bencilo.

50 El término “heterocicloalquilo”, según se emplea con referencia a HET anteriormente en este documento, se refiere a un sistema de anillo heterocíclico saturado de cuatro a ocho miembros, opcionalmente condensado a un sistema de anillo aromático o heteroaromático de cinco o seis miembros. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo comprenden homopiperazinilo, piperazinilo, piperidilo, pirrolidinilo, azetidino, 2-aza-biciclo[2.2.1]heptanilo, 3-aza-biciclo[3.1.0]hexanilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptanilo, 5,6,7,8-tetrahidro-2H-imidazo[1,2-a]pirazinilo, 5,6,7,8-tetrahidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazinilo, 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazinilo, 5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-d]pirimidilo, 5,6,7,8-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidilo, octahidropirrol[3,4-b]pirrolilo, octahidropirrol[3,4-c]pirrolilo, 6-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octanilo, 2,3-dihidroespiro[indeno-1,4'-piperidilo], espiro[indeno-1,4'-piperidilo], 1-oxa-8-azaespiro[4.5]decanilo, 8-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]oxazepinilo, hexahidro-2H-pirrol[3,4-d]isotiazolilo-1,1-dióxido, 2,7-diazaespiro[4,4]nonanilo, 6,7,8,9-tetrahidro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-g][1,4]diazepinilo, 5,6-dihidro-8H-imidazo[1,2-a]pirazinilo, 5,6-dihidro-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazinilo, 7,8-dihidro-5H-pirido[4,3-a]pirimidilo, 7,8-dihidro-5H-pirido[4,3-d]pirimidilo, pirazolo[1,5-a]pirimidilo, y similares.

60 El término “heteroarilo” significa un sistema anillo heterocíclico aromático monocíclico o policíclico. Ejemplos de grupos heteroarilo comprenden benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzoaxazolilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, bencimidazolilo, cinnolinilo, furanilo, furopiridilo, imidazolopirimidilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxadiazolilo, isoxazolilo, oxazolopiridilo, oxadiazolilo, oxazolilo, ftalazinilo, pteridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirrolopirimidilo, pirrolopiridilo, pirazolopirimidilo, pirazolilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiazolopiridilo, tienopiridilo, tienilo, triazinilo, triazolilo, 1,1-dioxo-1H-1,2-benzoisotiazolilo, oxazolopiridilo, y similares.

El término “oxo”, significa un grupo carbonilo formado por la combinación de un átomo de carbono y un átomo de oxígeno.

El término “sustituido” significa que un átomo de hidrógeno en una molécula se ha reemplazado por una molécula o átomo diferente. El átomo o molécula que reemplaza al átomo de hidrógeno se designa como un “sustituyente”.

El símbolo “-” representa un enlace covalente.

La frase “disolvente inerte” se refiere a un disolvente, o mezcla de disolventes, que no interactúa con los materiales iniciales, reactivos, intermedios, o productos en una forma que afecte adversamente sus propiedades deseadas.

Los términos “tratar”, “tratado”, o “tratamiento” tal como se emplean en el presente documento incluyen usos o resultados preventivos (por ejemplo, profilácticos), paliativos, y curativos.

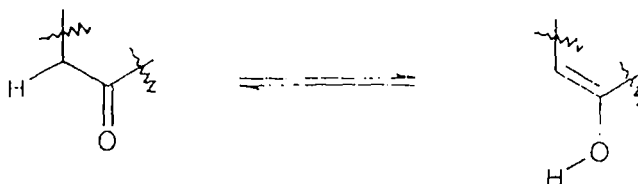
La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que (i) trata o previene la enfermedad, afección o trastorno en particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno en particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno en particular descrito en el presente documento.

El término “mamífero” es un animal individual que es un miembro de la clase taxonómica Mamíferos. La clase Mamíferos, incluye, por ejemplo, humanos, monos, chimpancés, gorilas, ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, perros, gatos, ratones y ratas. En la presente invención, el mamífero preferido es un ser humano.

Los compuestos de la presente invención se pueden resolver en los enantiómeros puros mediante procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo mediante formación de sales diastereoméricas las cuales se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización; formación de derivados diastereoméricos o complejos los cuales se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía líquido-gas o cromatografía líquida; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero, por ejemplo esterificación enzimática; o cromatografía líquido-gas o cromatografía líquida en un entorno quiral, por ejemplo en un soporte quiral por ejemplo sílice con un ligando quiral unido o en la presencia de un disolvente quiral. Se apreciará que donde el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación anteriormente descritos, se requiere una etapa adicional para liberar la forma enantiómera deseada. Alternativamente, los estereoisómeros específicos se pueden sintetizar usando un material de inicio ópticamente activo, mediante síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores, o disolventes ópticamente activos, o convirtiendo un estereoisómero en el otro mediante transformación asimétrica.

Cuando dichos compuestos contienen uno o más centros estereogénicos adicionales, aquellos expertos en la técnica apreciarán que todos los diastereómeros y mezclas diastereómeras de los compuestos ilustrados y discutidos en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Estos diastereómeros se pueden aislar mediante procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía líquido-gas o cromatografía líquida. Alternativamente, los intermedios a lo largo de la síntesis pueden existir en forma de mezclas racémicas y estar sometidos a resolución mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo mediante formación de sales diastereoméricas que se pueden separar, por ejemplo mediante cristalización; formación de derivados o complejos diastereómeros los cuales se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía líquido-gas o cromatografía líquida; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero, por ejemplo esterificación enzimática; o cromatografía líquido-gas o cromatografía líquida en un entorno quiral, por ejemplo sobre un soporte quiral, por ejemplo sílice, con un ligando quiral unido o en la presencia de un disolvente quiral. Se apreciará que cuando el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación anteriormente descritos, se requiere una etapa adicional para liberar la forma enantiómera deseada. Alternativamente, los estereoisómeros específicos se pueden sintetizar mediante síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores, o disolventes ópticamente activos, o convirtiendo un estereoisómero en el otro mediante transformación asimétrica.

Ciertos compuestos pueden existir en diferentes formas estables conformacionales las cuales pueden ser separables. La asimetría torsional debida a rotación restringida alrededor de un enlace sencillo asimétrico, por ejemplo debida a impedimento estérico o tensión de anillo, puede permitir la separación de diferentes conformeros. La presente invención incluye cada isómero conformacional de compuestos de la invención y mezclas de los mismos. Quienes lleven esto a la práctica apreciarán que ciertos compuestos pueden existir en forma tautomérica, es decir, que un equilibrio existe entre dos isómeros los cuales están en un equilibrio rápido el uno con el otro. Un ejemplo común de tautomería es la tautomería ceto-enólica, es decir,



Ejemplos de tales compuestos de la presente invención incluyen, entre otros, hidroxipiridinas (piridonas) e hidroxipirimidinas (pirimidonas). En particular, una persona experta en la técnica reconocerá que una hidroxipiridina de la invención actual puede existir como dos tautómeros separados, por ejemplo,



El grado al cual está presente un tautómero respecto del otro depende de diversos factores, incluyendo el patrón de sustitución y el tipo de disolvente. Otros ejemplos de acuerdo con la presente invención se reconocerán por aquellos expertos en la técnica. Todas las formas tautoméricas se incluyen dentro del alcance de la invención reivindicada.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas igual que en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares, y se desea que la invención abarque formas no solvatadas, formas solvatadas y mezclas de formas solvatadas.

Ciertos compuestos y sus sales y solvatos pueden existir en más de una forma cristalina. Los polimorfos de los compuestos representados por la fórmula (I) forman parte de esta invención y se pueden preparar mediante cristalización de un compuesto de fórmula (I) bajo condiciones diferentes. Por ejemplo, usando diferentes disolventes o diferentes mezclas de disolventes para recristalización; cristalización a diferentes temperaturas; diversos modos de enfriamiento, variando de enfriamiento muy rápido a muy lento durante cristalización. Los polimorfos se pueden obtener también calentando o fundiendo un compuesto de fórmula (I) seguido por enfriamiento gradual o rápido. La presencia de polimorfos se puede determinar mediante espectroscopía de RMN de sonda sólida, espectroscopía de IR, calorimetría de barrido diferencial, difracción de rayos X en polvo u otras técnicas similares.

Esta invención incluye también compuestos marcados isotópicamente, los cuales son idénticos a aquellos descritos mediante la fórmula (I), excepto por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra usualmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y flúor, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I , ^{129}I , y ^{18}F respectivamente. Los compuestos de la presente invención, profármacos de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos o de los profármacos los cuales contienen los isótopos mencionados anteriormente y/o otros isótopos u otros átomos están dentro del alcance de esta invención. Ciertos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos dentro de los cuales se incorporan los isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución en tejidos de fármacos y/o sustratos. Los isótopos tritio (es decir, ^3H), y carbono-14 (es decir, ^{14}C), se prefieren particularmente por su facilidad de preparación y detectabilidad. Adicionalmente, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (es decir, ^2H), pueden proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de estabilidad metabólica mayor, por ejemplo semivida incrementada *in vivo* o requerimientos de dosificación reducidos y, así, se pueden preferir en algunas circunstancias. Los compuestos de fórmula (I) de esta invención y profármacos de los mismos marcados isotópicamente se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos discutidos en los esquemas y/o los ejemplos más adelante, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo fácilmente disponible marcado isotópicamente.

Las sales farmacéuticamente aceptables, según se usan en el presente documento en relación a los compuestos de la presente invención, incluyen sales inorgánicas y orgánicas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de un compuesto, o haciendo reaccionar por separado el compuesto o profármaco con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen, pero no se limitan a, las sales bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, trifluoroacetato, oxalato, besilato, palmitato, pamoato, malonato, estearato, laurato, malato, borato, benzoato, lactato, fosfato, hexafluorofosfato, bencenosulfonato, tosilato, formiato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares. Estas pueden incluir también cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, al igual que cationes amonio, amonio cuaternario, y amina no tóxicos, incluyendo, pero no limitados a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. Para ejemplos adicionales véase, por ejemplo, Berge y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Los compuestos de la presente invención se pueden aislar y usar por sí mismos o en la forma de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con la presente invención, los compuestos con múltiples átomos de nitrógeno básicos pueden formar sales con número variable de equivalentes de ácido. Se entenderá por los que lleven la invención a la práctica que tales sales están todas dentro del alcance de la presente invención.

Un profármaco de un compuesto de fórmula (I) puede ser uno formado en una manera convencional con un grupo funcional del compuesto, tal como con un grupo amino, hidroxilo o carboxilo. El término "profármaco" significa un compuesto que se transforma *in vivo* produciendo un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto. La transformación puede ocurrir mediante diversos mecanismos, tales como por hidrólisis de la sangre. Una discusión del uso de profármacos se proporciona por T. Higuchi y W. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche. American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

Por ejemplo, si un compuesto de la presente invención incorpora un grupo funcional amino, un profármaco puede estar formado por el reemplazamiento de un átomo de hidrógeno del grupo amino con un grupo tal como R-carbonilo, RO-carbonilo, NRR'-carbonilo donde R y R' son cada uno independientemente alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo(C₃-C₇), bencilo, o R-carbonilo es un α -aminoácido natural o un α -aminoácido natural- α -aminoácido natural, -C(OH)C(O)OY' en el que Y' es H, alquilo(C₁-C₆) o bencilo, -C(OY₀)Y₁ en el que Y₀ es alquilo(C₁-C₄) e Y₁ es alquilo(C₁-C₆), carboxialquilo(C₁-C₆), aminoalquilo(C₁-C₄) o mono-N- o di-N,N-alquilaminoalquilo(C₁-C₆), -C(Y₂)Y₃ en el que Y₂ es H o metilo y Y₃ es mono-N- o di-N,N-alquilamino(C₁-C₆), morfolino, piperidin-1-ilo o pirrolidin-1-ilo.

De forma similar, si un compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional alcohol, se puede formar un profármaco mediante el reemplazamiento del átomo de hidrógeno del grupo alcohol por un grupo tal como alcanoiloximetilo(C₁-C₆), 1-(alcanoiloxi(C₁-C₆))etilo, 1-metil-1-(alcanoiloxi(C₁-C₆))etilo, alcoxicarboniloximetilo(C₁-C₆), N-alcoxicarbonilaminometilo(C₁-C₆), succinilo, alcanilo(C₁-C₆), α -aminoalcanilo(C₁-C₄), arilacilo y α -aminoácido, o α -aminoácido- α -aminoácido, donde cada grupo α -aminoácido se selecciona independientemente de los L-aminoácidos que se dan en la naturaleza, P(O)(OH)₂, -P(O)(O(alquilo(C₁-C₆)))₂ o glicosilo (el radical resultante de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato).

Si un compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado mediante el reemplazamiento del átomo de hidrógeno del grupo ácido por un grupo tal como alquilo(C₁-C₈), alcanoiloximetilo(C₂-C₁₂), 1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcoxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcoxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcoxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-alquilamino(C₁-C₂)alquilo(C₂-C₃) (tal como β -dimetilaminoetilo), carbamoil-alquilo(C₁-C₂), N,N-dialquil(C₁-C₂)carbamoil-alquilo(C₁-C₂) y piperidino-, pirrolidino- o morfolinoalquilo(C₂-C₃).

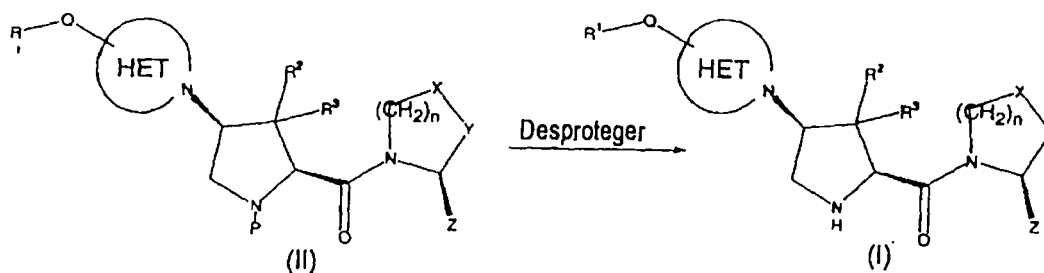
En general, los compuestos de fórmula (I) de esta invención se pueden preparar mediante procedimientos que incluyen procedimientos conocidos en las artes técnicas químicas, particularmente a la luz de la descripción contenida en el presente documento. Ciertos procedimientos para la elaboración de los compuestos de fórmula (I) de esta invención se ilustran mediante los siguientes esquemas de reacción. Otros procedimientos se describen en la sección experimental. Los procedimientos discutidos en los esquemas y ejemplos actuales se desean para propósitos de ejemplificar la presente invención, y no son para interpretarse de ninguna manera como limitaciones en ella.

Algunos de los compuestos de partida para las reacciones descritas en los esquemas y ejemplos se preparan como se ilustra en el presente documento. Todos los otros compuestos de partida se pueden obtener a partir de fuentes comerciales generales, tales como Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO.

En las discusiones más adelante, se usan las siguientes abreviaturas: BOC (*tert*-butoxicarbonilo), Cbz (bencilo-xicarbonilo), DMF (N,N-dimetilformamida), NMP (N-metil-2-pirrolidinona), DMAC (N,N-dimetilacetamida), DME (dimetoxietano), DMSO (dimetilsulfóxido), EtOAc (acetato de etilo), EtOH (etanol), MeOH (metanol), TFA (ácido trifluoroacético), TFAA (anhídrido trifluoroacético), TEA (triethylamina), THF (tetrahydrofurano), DIPEA (diisopropyletilamina), EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-carbodiimida), DCC (diclohexilcarbodiimida), CDI (1,1'-carbonil-diimidazol), HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HOAT (1-hidroxio-7-azabenzotriazol), HOBT (N-hidroxibenzotriazol), y EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina).

Un procedimiento generalizado para preparar los compuestos de fórmula (I) se representa en el esquema I a continuación en el presente documento.

Esquema 1



en el que

R^1 es -alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -arilalquilo(C_1-C_6), $-NR^aR^b$, hidroxilo, ciano, arilo, o heteroarilo, en los que dicho -alquilo(C_1-C_6), dicho arilo, o dicho heteroarilo está sustituido opcionalmente de forma independiente con de uno a tres -COOH, -C(O)alcoxi(C_1-C_6), -C(O)alquilo(C_1-C_6), $-C(O)NR^aR^b$, ciano, halógeno, nitro, trifluorometilo, -alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -cicloalquilo(C_3-C_6), o fenilo, y en el que R^a y R^b son, independientemente, hidrógeno, -alquilo(C_1-C_6), arilo, o heteroarilo, o R^a y R^b , tomados conjuntamente con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo heterocíclico de cuatro a seis miembros, en el que dicho anillo heterocíclico incorpora opcionalmente uno o dos heteroátomos de anillo adicionales de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

R^2 y R^3 son, independientemente, hidrógeno, halógeno, -alquilo(C_1-C_6) o -cicloalquilo(C_3-C_8);

Q es un enlace covalente, -C(O)-, o -SO₂-;

HET es un resto anillo heterocicloalquilo, sustituido opcionalmente con (A) de uno a cuatro -alquilo(C_1-C_6), sustituidos opcionalmente con de uno a seis átomos de halógeno, -alcoxi(C_1-C_6), ciano, halógeno, hidroxilo, o $-NR^aR^b$, o (B) -arilalquilo(C_1-C_6), sustituido opcionalmente con de uno a seis átomos de halógeno, -alcoxi(C_1-C_6), ciano, halógeno, hidroxilo, o $-NR^aR^b$;

n es cero o uno;

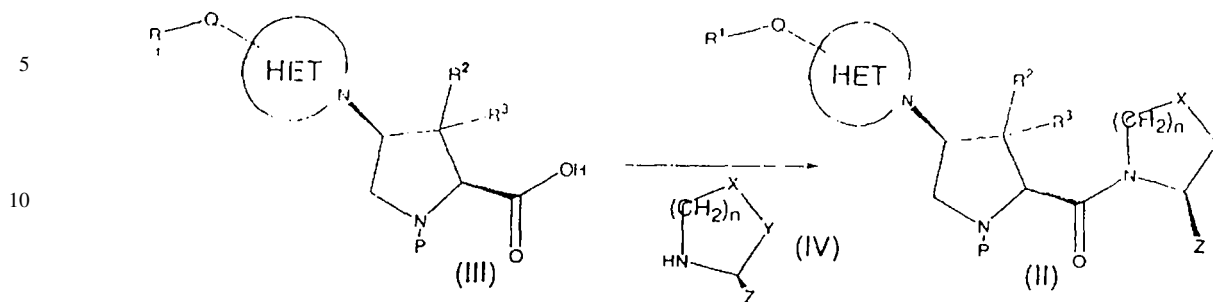
X es -CH₂-, -CHF-, o -CF₂- e Y es -CH₂-, -CHF-, o -CF₂-, con la condición de que cuando n es uno y X e Y no son ambos CH₂ y cuando n es cero X es -CH₂-; y

Z es hidrógeno o ciano.

En el esquema 1, un compuesto de fórmula (II), preparado como se describe en el esquema 2, en el que P representa un grupo protector de nitrógeno, se desprotege de acuerdo a procedimientos conocidos. Si P representa BOC, la desprotección se lleva a cabo típicamente tratando en primer lugar (II), disuelto en un disolvente tal como EtOAc, éter dioxano o agua, con enfriamiento opcional a una temperatura adecuada, tal como aproximadamente 0°C, con ácido (por ejemplo, cloruro de hidrógeno) durante un tiempo adecuado, tal como de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente una hora. La disolución se deja calentar a temperatura ambiente (TA), seguido por agitación durante una cantidad adicional de tiempo, típicamente de unos 30 minutos adicionales a aproximadamente 16 horas adicionales. Preferiblemente, la mezcla de reacción se agitó aproximadamente 15 minutos, se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, después se agitó durante 30 minutos adicionales. Alternativamente, (II) se disolvió en TFA y, después de un tiempo adecuado (por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas), el exceso de TFA se eliminó al vacío, y el producto residual se trituró con un disolvente tal como éter. Si P representa Cbz, la desprotección se puede llevar a cabo mediante hidrogenólisis en la presencia de catalizador, tal como paladio al 10% o hidróxido de paladio al 10%, en un disolvente adecuado tal como EtOH o EtOAc a una presión de aproximadamente 206842,8 pascales (30 psi) a aproximadamente 413685,6 pascales (60 psi), durante un periodo suficiente de tiempo, usualmente durante toda una noche, a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 80°C. Preferiblemente, la hidrogenólisis se realiza a una presión de aproximadamente 310264,2 pascales (45 psi) a temperatura ambiente.

Los compuestos de fórmula (II) se pueden preparar acoplado un derivado de ácido carboxílico apropiadamente sustituido (III) con un derivado de amina apropiadamente sustituido (IV) como se describe a continuación en el presente documento en el esquema 2.

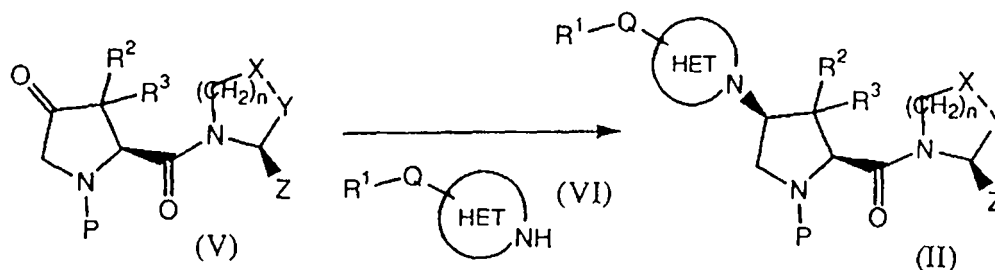
Esquema 2



El acoplamiento se realiza típicamente combinando (III) y (IV) en un disolvente inerte a la reacción, preferiblemente un disolvente aprótico tal como acetonitrilo, diclorometano, DMF, THF, o cloroformo. Se añade después un agente de acoplamiento, tal como EDC, HATU, DCC, EEDQ, CDI, cloruro de pivaloilo o dietilfosforilcianuro, opcionalmente en la presencia de una base, tal como TEA o piridina, y un coadyuvante opcional, tal como HOBT o HOAT. El acoplamiento se lleva a cabo típicamente a una temperatura de entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, durante un tiempo adecuado, tal como durante aproximadamente una hora a aproximadamente 24 horas, por ejemplo aproximadamente 16 horas. Para una discusión de otras condiciones útiles para acoplar ácidos carboxílicos véase Houben-Weil, vol. XV, parte II, E. Wunsch, Ed., G. Theime Verlag, (1974), Stuttgart; M. Bodansky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag Berlín (1984); y "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology" (ed. E. Gross y J. Meienhofer), volúmenes 1-5 (Academic Press NY 1979-1983). Los compuestos de fórmulas (III) y (IV) se pueden preparar mediante procedimientos conocidos o, alternativamente, de acuerdo a procedimientos preparativos ejemplares descritos más adelante en el presente documento. Para las preparaciones ejemplares de fórmula (IV), véase PCT International Application Publication N°. WO 2003/101958 y la patente de los Estados Unidos N°. 6.710.040, cuya descripción se incorpora en el presente documento mediante referencia.

Alternativamente, los compuestos de fórmula (II) se pueden preparar como se describe a continuación en el esquema 3.

Esquema 3

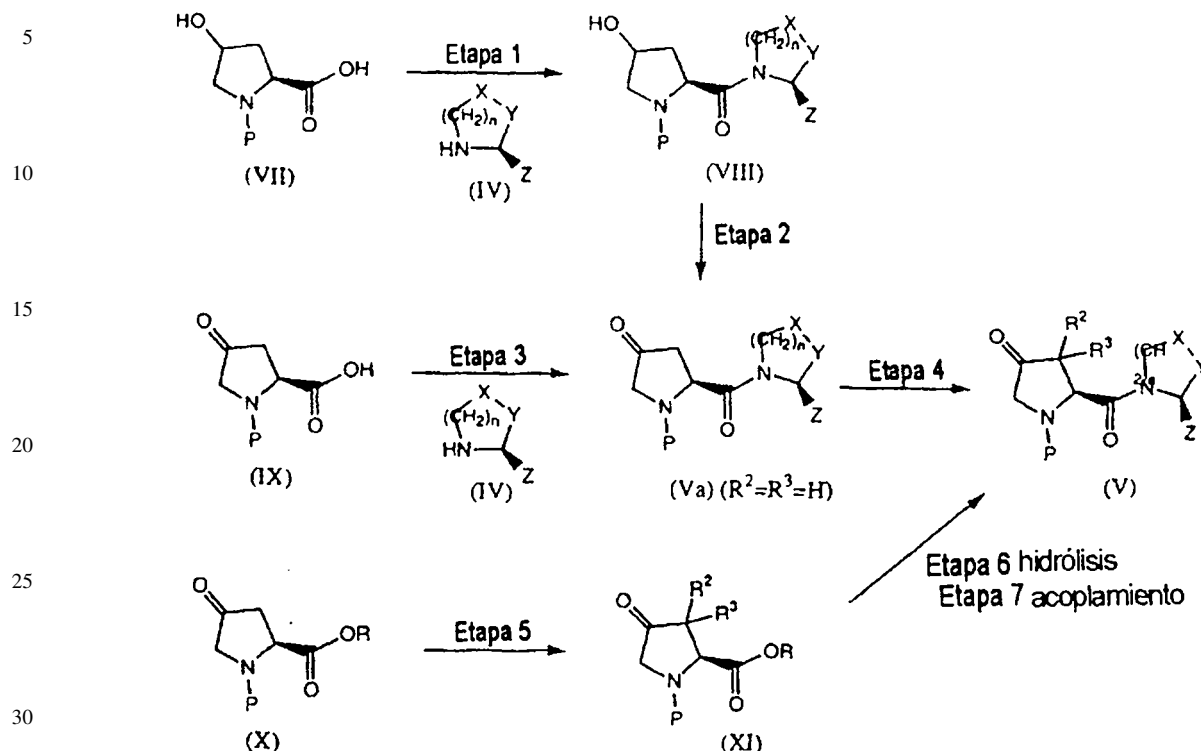


En el esquema 3, los compuestos de fórmula (II) se preparan mediante aminación reductora de una cetona protegida (V), preparada como se describe a continuación en el presente documento en el esquema 4, con una heterocicloalquilamina (VI) apropiadamente sustituida. Tales reacciones de aminación son bien conocidas para alguien experto en la técnica. Véase, por ejemplo, A.F. Abdel-Magid, y col., J. Org. Chem., 61, 3849 (1996); R.F. Borch, y col., J. Am. Chem. Soc., 93, 2897 (1971); y S. Bhattacharyya, y col., Synlett, 1079 (1995). Las aminas de fórmula (VI) se conocen bien en la técnica relevante y pueden obtenerse comercialmente o prepararse mediante procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, D.A. Horton y col., Chem. Rev., 103, 893-930 (2003), H. Fukui, y col., Heterocycles, 56, 257-264 (2002), M.Y. Chu-Moyer, y col., J. Org. Chem., 60, 5721-5725 (1995), y J.P. Yevich, y col., J. Med. Chem., 29, 359-369 (1986).

Típicamente, (V) y (VI) se condensan en presencia de un agente reductor tal como borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de tetrametilamonio, o hidrógeno en presencia de un catalizador (Pd al 10%/C, óxido de platino, etc.), opcionalmente en presencia de un ácido (por ejemplo ácido acético (AcOH), ácido clorhídrico, etc.). El acoplamiento se lleva a cabo normalmente en un disolvente inerte a la reacción, tal como 1,2-dicloroetano, THF, DMF, EtOH o MeOH. La reacción se lleva a cabo a una temperatura adecuada, tal como de 0 a 50°C, durante un periodo de tiempo adecuado, tal como entre aproximadamente una y aproximadamente 24 horas, por ejemplo, aproximadamente 16 horas.

Los compuestos de fórmula (V) se pueden preparar como se describe a continuación en el presente documento en el esquema 4, comenzando con, según sea apropiado, ácido carboxílico (VII) comercialmente disponible, ácido cetocarboxílico (IX), o cetoéster (X).

Esquema 4



En el esquema 4, etapa 1, el ácido protegido (VII) se acopla con amina (IV) según se describe anteriormente en el presente documento en el esquema 2 proporcionando alcohol (VIII).

En el esquema 4, etapa 2, el alcohol (VIII) se oxida a cetona (Va) tratando (VIII) con un agente oxidante en un disolvente inerte a la reacción. Ejemplos de agentes oxidantes apropiados comprenden piridina/trióxido de azufre en DMSO; hipoclorito de sodio acuoso en presencia de bromuro de sodio y el catalizador radical libre TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi); reactivos basados en cromo, tales como trióxido de cromo, dicromato de piridinio, o clorocromato de piridinio; y cloruro de oxalilo en DMSO en presencia de una amina terciaria. Ejemplos de disolventes inertes a la reacción comprenden diclorometano, EtOAc, tolueno, o piridina. La oxidación se lleva a cabo típicamente a una temperatura de entre aproximadamente -78°C y aproximadamente 50°C , para entre aproximadamente una y aproximadamente 24 horas, por ejemplo, aproximadamente 16 horas. Tales oxidaciones son conocidas para alguien experto en la técnica. Véase, por ejemplo, M. Tamaki, y col., J. Org. Chem., 66, 3593 (2001) y X-I, Qiu, y col., J. Org. Chem., 67, 7162 (2002).

En el esquema 4, etapa 3, el ácido cetocarboxílico (IX) se acopla primero con amina (IV), según se describe anteriormente en el presente documento en el esquema 2, proporcionando (Va), el cual se alquila después proporcionando cetona (V). La alquilación se lleva a cabo típicamente formando primero una enamina haciendo reaccionar cetona (Va) con una amina secundaria, por ejemplo, pirrolidina, piperidina o morfolina, seguida por tratamiento con un agente alquilante, opcionalmente en presencia de una base, tal como carbonato de potasio. Típicamente, la reacción se lleva a cabo en un disolvente tal como benceno, tolueno, acetonitrilo, o dioxano. Tales conversiones son conocidas para alguien experto en la técnica. Véase, por ejemplo, G. Stork y col., J. Am. Chem. Soc., 85, 207 (1963); M.W. Holladay, y col., J. Med. Chem., 34, 455 (1991); y P. Barraclough, y col., Tetrahedron, 51, 4195 (1995).

En el esquema 4, etapa 5, el cetoéster protegido (X), en el que R representa un resto alquilo o arilalquilo, se alquila bajo las condiciones previamente descritas en la etapa 4 proporcionando cetoéster (XI).

En el esquema 4, etapa 6, el cetoéster (XI) se saponifica produciendo el correspondiente ácido carboxílico el cual, en la etapa 7, se acopla con una amina apropiadamente sustituida (IV), como se describe previamente anteriormente en el presente documento en el esquema 2. La etapa de saponificación se lleva a cabo típicamente disolviendo (XI) en un disolvente miscible en agua, tal como MeOH o EtOH, y agua en presencia de una base, tal como hidróxido de litio o hidróxido de sodio. La saponificación se lleva a cabo a temperatura adecuada, tal como entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 100°C , preferiblemente a temperatura ambiente, durante un tiempo adecuado, tal como entre aproximadamente una y aproximadamente 24 horas, por ejemplo, aproximadamente 16 horas.

Preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (IA), o un profármaco del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o profármaco, o un solvato del compuesto, profármaco o sal, y un transportador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto (3,3-difluoropirrolidin-1-il)-((2*S*,4*S*)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il) metanona, o un profármaco del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o profármaco, o un solvato de dicho compuesto, profármaco o sal; y un transportador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas formadas combinando los compuestos de esta invención y los transportadores, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación tales como comprimidos, polvos, pastillas, jarabes, disoluciones inyectables y similares. Estas composiciones farmacéuticas pueden, si se desea, contener ingredientes adicionales tales como aromatizantes, aglutinantes, excipientes y similares.

Así, para los propósitos de administración oral, los comprimidos que contienen diversos excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y/o fosfato de calcio, se pueden emplear con diversos disgregantes tales como almidón, ácido alginico y/o ciertos silicatos complejos, junto con agentes de unión tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y/o goma arábica. Adicionalmente, los agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco son a menudo útiles para los propósitos de formación de comprimidos. Se pueden emplear también composiciones sólidas de un tipo similar como agentes de carga en cápsulas de gelatina cargadas blandas y duras. Los materiales preferidos para esto incluyen lactosa o azúcar de leche y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas o elixires para administración oral, el agente farmacéutico activo en ellas puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes y, si se desea, agentes emulsionantes o de suspensión, conjuntamente con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y/o combinaciones de los mismos.

Para la administración parenteral, se pueden emplear disoluciones de los compuestos o composiciones de esta invención en aceite de sésamo o de cacahuete, propilenglicol acuoso, o en disoluciones acuosas estériles. Tales disoluciones acuosas deberían tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero hacerse isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles empleados están todos disponibles fácilmente mediante técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Para la administración intranasal o administración mediante inhalación, los compuestos o composiciones de la invención se administran convenientemente en la forma de una disolución o suspensión a partir de un recipiente pulverizador de bomba, que se aprieta o bombea por el paciente o como una presentación de pulverización de aerosol a partir de un recipiente presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad deseada. El recipiente o nebulizador presurizado puede contener una disolución o suspensión de un compuesto de esta invención. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo de un compuesto o compuestos de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Se conocen procedimientos para preparar diversas composiciones farmacéuticas con una cierta cantidad de ingrediente activo, o serán evidentes a la luz de esta discusión, para aquellos expertos en esta técnica. Para ejemplos de procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa, 19ª edición (1995).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, la cual comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto; un segundo compuesto que es un agente antidiabético seleccionado de insulina y análogos de insulina; insulínotropina; biguanidas; α_2 -antagonistas e imidazolinis; glitazonas; inhibidores de aldosa reductasa; inhibidores de glucógeno fosforilasa; inhibidores de sorbitol deshidrogenasa; inhibidores de oxidación de ácidos grasos; inhibidores de α -glucosidasa; β -agonistas; inhibidores de fosfodiesterasa; agentes que disminuyen los lípidos; agentes antiobesidad; vanadato y complejos de vanadio y complejos de peroxovanadio; antagonistas de amilina; antagonistas de glucagón; secretagogos de hormona del crecimiento; inhibidores de gluconeogénesis; análogos de somatostatina; agentes antilipolíticos; un profármaco de agentes antidiabéticos; o una sal farmacéuticamente aceptable de los agentes antidiabéticos y los profármacos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende: una primera forma de dosificación que comprende un compuesto de la invención, o un profármaco del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto; y una segunda forma de dosificación que comprende un agente antidiabético seleccionado de insulina y análogos de insulina; insulínotropina, biguanidas; α_2 -antagonistas e imidazolinis; glitazonas; inhibidores de aldosa reductasa; inhi-

bidores de glucógeno fosforilasa; inhibidores de sorbitol deshidrogenasa; inhibidores de la oxidación de ácidos grasos; inhibidores de α -glucosidasa; β -agonistas; inhibidores de fosfodiesterasa; agentes que disminuyen los lípidos; agentes antiobesidad; vanadato y complejos de vanadio y complejos de peroxovanadio; antagonistas de amilina; antagonistas de glucagón; secretagogos de hormona del crecimiento; inhibidores de gluconeogénesis; análogos de somatostatina; agentes antilipolíticos; profármacos de agentes antidiabéticos; o sales farmacéuticamente aceptables de los agentes antidiabéticos y los profármacos; y un recipiente para contener dicha primera dosificación (a) y dicha segunda dosificación (b). En una realización preferida del kit, tanto la primera como la segunda formas de dosificación comprenden independientemente un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar un agente secretagogo de insulina para diabetes, comprendiendo: administrar un agente de la invención a un ratón KK/H1J con síntomas diabéticos, en ayuno; y valorar una respuesta en el ratón a una exposición de glucosa oral subsiguiente, en la que, si dicho ratón demuestra una mejora en los síntomas, dicho agente se identifica como un tratamiento para la diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, tolerancia a glucosa alterada, hiperglucemia, síndrome metabólico (síndrome X y/o síndrome de resistencia a insulina), glucosuria, acidosis metabólica, artritis, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, cardiomiopatía diabética, obesidad, afecciones exacerbadas por obesidad, hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis, osteoporosis, osteopenia, fragilidad, pérdida de hueso, fractura de hueso, síndrome coronario agudo, estatura corta debida a deficiencia en la hormona del crecimiento, infertilidad debida al síndrome ovárico poliquístico, ansiedad, depresión, insomnio, fatiga crónica, epilepsia, trastornos de la alimentación, dolor crónico, adicción al alcohol, enfermedades asociadas con motilidad intestinal, úlceras, síndrome del intestino irritable; síndrome del intestino inflamatorio; síndrome del intestino corto; y la prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

En general, una dosificación efectiva para los compuestos de la presente invención está en el intervalo de 0,01 mg/kg/día a 30 mg/kg/día, preferiblemente de 0,01 mg/kg/día a 5 mg/kg/día de compuesto activo en dosis únicas o divididas. Ocurrirá necesariamente, sin embargo, alguna variación en la dosificación, dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. El individuo responsable de la dosificación determinará, en cualquier caso, la dosificación apropiada para el sujeto individual. Los que lleven a la práctica la invención apreciarán que “kg” se refiere al peso del paciente medido en kilogramos.

Los compuestos o composiciones de esta invención se pueden administrar en dosis individuales (es decir, una vez al día) o múltiples o por medio de infusión constante. Los compuestos de esta invención se pueden administrar también solos o en combinación con transportadores, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, bien en dosis únicas o bien en dosis múltiples. Los transportadores, vehículos o diluyentes farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes sólidos inertes o agentes de carga, disoluciones acuosas estériles y diversos disolventes orgánicos.

Los compuestos o composiciones de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento mediante una diversidad de vías de administración convencionales, que incluyen oralmente y parenteralmente, (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente o intramedularmente). Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar intranasalmente, como un supositorio, o usando una formulación “ultrarrápida”, es decir, que permite a la medicación disolverse en la boca sin la necesidad de usar agua.

Ejemplificación

A menos que se señale lo contrario, todos los reactivos se obtuvieron comercialmente.

La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por W.C. Still y col. en *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2923.

Preparatorio experimental

Los compuestos e intermediarios de la presente invención se llamaron generalmente de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC (Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada) sobre las reglas de Nomenclatura de Química Orgánica y las reglas del Índice CAS.

Preparación 1

(2S)-2-[(3,3-difluoropirrolidin-1-il)carbonilo]-4-oxopirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo

Etapa 1

(2S,4R)-2-[(3,3-difluoropirrolidina-1-il)carbonilo]-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo

Se añadió TEA (0,77 ml, 5,5 mmol) a una suspensión de clorhidrato de 3,3-difluoropirrolidina (0,79 g, 5,5 mmol; Synlett, 55 (1995)), en 10 ml de diclorometano. Después de cinco minutos, se añadieron (4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-hidroxi-L-prolina (1,16 g, 5 mmol), HOBt (0,74 g, 5,5 mmol), y EDC (1,05 g, 5,5 mmol). Después de agitar la reacción durante toda una noche, la mezcla se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía (Biotage® Flash 40S (A Dynax Corp.; Charlottesville, VA), 9:1 diclorometano:metanol) proporcionando 1,07 g de una espuma

ES 2 327 857 T3

rosa claro. El producto adicional (0,26 g) se obtuvo mediante extracciones repetidas con diclorometano de la fase acuosa proporcionando un rendimiento general de 1,33 g (83%). MS m/z 321 (MH⁺).

Etapa 2

Se añadió gota a gota DMSO (0,57 ml, 8 mmol) en 3 ml de diclorometano a una disolución de cloruro de oxalilo (0,38 ml, 4,4 mmol) en 10 ml de diclorometano a -65°C. Después de cinco minutos, se añadió una disolución del producto de la etapa 1 (1,28 g, 4 mmol) en 20 ml de diclorometano. Después de 15 minutos, se añadió TEA (2,79 ml, 20 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla se vertió en hielo. La fase orgánica se separó, se lavó secuencialmente con disolución de NaHCO₃ al 10% y salmuera, se secó (MgSO₄), y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía (Biotage® Flash 40S, 95:5 diclorometano:MeOH) proporcionando 765 mg (60%) del compuesto del título. MS m/z 319 (MH⁺).

Alternativamente, el (2S)-2-[(3,3-difluoropirrolidin-1-il)carbonil]-4-oxopirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo se puede preparar de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Se disolvieron 1-(*terc*-butoxicarbonil)-4-oxo-L-prolina (6,88 g, 30 mmol), HOBt (4,46 g, 33 mmol), EDC (6,326 g, 33 mmol), y clorhidrato de 3,3-difluoropirrolidina (4,52 g, 31,5 mmol) en 100 ml de diclorometano y la mezcla de reacción se enfrió a 0°C en un baño de hielo antes de añadir TEA (8,4 ml, 60 mmol). La mezcla de reacción se dejó después calentar a temperatura ambiente. Después de agitar durante toda una noche, se añadió bicarbonato de sodio saturado (100 ml) y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía (Biotage® Flash 40M, eluyendo con diclorometano:hexanos 1:10) proporcionando el compuesto del título 7,85 g (rendimiento del 82%). MS (EI) m/z 319,3 (MH⁺).

Preparación 2

(2S)-2-[[[(3R*,4S*)-3,4-difluoropirrolidin-1-il]carbonil]-4-oxopirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo

Etapa 1

(2S,4R)-2-[[[(3R*,4S*)-3,4-difluoropirrolidin-1-il]carbonil]-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo

Se acopló (4R)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-4-hidroxi-L-prolina (2,31 g, 10 mmol), con clorhidrato de (3R,4S)-*rel*-3,4-difluoropirrolidina (1,44 g, 10 mmol, preparación 4), en una forma análoga a la que se describe en la preparación 1, etapa 1, proporcionando 2,15 g (67%) del producto título como una espuma blanquecina. MS m/z 321 (MH⁺).

Etapa 2

El producto de la etapa 1 (1,97 g, 6,15 mmol) se oxidó en una forma análoga a la que se describe en la preparación 1, etapa 2, proporcionando 0,74 g (38%) del compuesto del título como un sólido amarillo claro. MS m/z 319 (MH⁺).

Preparación 3

(4S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(4-pirimidin-2-ilpiperazin-1-il)-L-prolina

Se disolvieron 1-(*terc*-butoxicarbonil)-4-oxo-L-prolina (1,0 g, 4,4 mmol), 2-piperazin-1-ilpirimidina (0,73 g, 4,4 mmol), y ácido acético (275 µl, 4,6 mmol) en 20 ml de 1,2-dicloroetano anhidro y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,85 g, 8,7 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la mezcla de reacción se desactivó con NaHCO₃ saturado. El pH se ajustó a pH 7 mediante adición de NaHCO₃ sólido y HCl concentrado, la mezcla se extrajo con diclorometano, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró proporcionando 1,0 (61%) de material en bruto que estaba suficientemente puro para uso adicional. MS m/z 378 (MH⁺).

Preparación 4

Clorhidrato de (3R,4S)-*rel*-3,4-difluoro-pirrolidina

Etapa 1

Éster bencílico del ácido 2,5-dihidro-pirrol-1-carboxílico

Se añadió 3-pirrolina (10 g, 0,145 mol) a una suspensión de bicarbonato de sodio (14 g, 0,17 mol) en tolueno (100 ml). La mezcla se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota cloroformiato de bencilo (23 ml, 0,16 mol). Después de agitar durante toda una noche la disolución se diluyó con diclorometano, se lavó con agua fría y salmuera, se secó sobre

ES 2 327 857 T3

sulfato de magnesio, y se concentró dando un aceite amarillo pálido que se destiló al vacío. P.e.: 119-126°C (0,32 mm) (47,2 Pa).

Etapa 2

Éster bencílico del ácido 6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.0]hexano-3-carboxílico

El compuesto del título de la etapa 1 (3,0 g, 15 mmol) se disolvió en una mezcla de acetonitrilo (100 ml) y agua (70 ml) conteniendo sal disódica dihidratada de tetraacetato de etilendiamina (11 mg, 0,03 mmol). La disolución se enfrió a 0°C y se añadió 1,1,1-trifluoroacetona (14,5 ml, 160 mmol) durante 10 minutos. Se añadió por partes peroximonosulfonato de potasio (45 g, 74 mmol) durante 40 minutos manteniendo el pH a 7 mediante la adición de bicarbonato sódico. La mezcla se agitó a 0°C durante 1,5 horas vertiéndose después en agua y extrayéndose con diclorometano. Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron dando un aceite incoloro (3,45 g, 100%).

Etapa 3

Éster bencílico del ácido (3RS,4RS)-3-fluoro-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxílico

Se calentó una mezcla de trifluorhidrato de TEA (1,95 ml, 12 mmol) y el compuesto del título de la etapa 2 (2,62 g, 12 mmol) a 155°C durante 3 horas, se enfrió y se repartió entre agua y diclorometano. La fase acuosa se extrajo de nuevo con diclorometano y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (metanol al 1% en diclorometano) dando el compuesto del título como un aceite pálido (1,14 g, 40%).

Etapa 4

Éster bencílico del ácido (3R,4S)-rel-3,4-difluoro-pirrolidina-1-carboxílico

Una disolución del compuesto del título de la etapa 3 en diclorometano (15 ml) se enfrió a -50°C y se añadió trifluoruro de [bis(2-metoxietil)amino]azufre (1,3 ml, 6,9 mmol). La disolución se calentó a temperatura ambiente durante 18 horas, después se repartió entre agua y EtOAc. La fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (diclorometano) dando el producto como un aceite marrón (1,14 g, 40%).

Etapa 5

Una disolución del compuesto del título de la etapa 4 (675 mg, 2,8 mmol) en EtOH (10 ml) conteniendo Pd al 10%/C (200 mg) se hidrogenó a 275790,4 pascales (40 psi) en un aparato Parr durante 18 horas. La disolución se filtró sobre tierra de diatomeas y el filtrado se concentró hasta sequedad, dejando un sólido amarillo (400 mg, 100%).

Preparación 5

Éster terc-butílico del ácido (S)-2-(3-fluoro-azetidina-1-carbonil)-4-oxo-pirrolidina-1-carboxílico

Etapa 1

Clorhidrato de benzhidril-3-fluoro-azetidina

Se disolvió 1-benzhidril-azetidin-3-ol (5,0 g, 20,9 mmol) en 50 ml de benceno, la disolución se enfrió a 15°C, y se añadió gota a gota trifluoruro de (dietilamino)azufre (10,1 g, 62,7 mmol). Después de agitar durante toda una noche a temperatura ambiente, se añadió bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se extrajo con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía (Biotage® 40S, EtOAc al 10%/hexanos). El producto se disolvió en EtOAc, se trató con HCl (15 ml, 2N en éter), se calentó brevemente, y se concentró. El sólido se trituró con éter, se filtró, y se secó proporcionando 2,58 g del compuesto del título. MS m/z 242,3 (MH⁺).

Etapa 2

Clorhidrato de 3-fluoro-azetidina

Una disolución del producto de la Etapa 1 (2,58 g, 9,3 mmol) en 30 ml de metanol que contiene Pd al 10%/C (0,38 g) se hidrogenó a 206842,8-344738 pascales (30-50 psi) en un aparato Parr durante 60 horas. La disolución se filtró sobre tierra de diatomeas y el filtrado se concentró hasta sequedad. El sólido se recrystalizó a partir de MeOH/EtOAc suministrando 0,62 g (60%) del compuesto del título.

Etapa 3

Se mezclaron N-*terc*-Boc-4-oxo-L-prolina (917 mg, 4 mmol), el compuesto del título de la etapa 2 (446 mg, 4 mmol), y HATU (1,673 g, 4,4 mmol) bajo nitrógeno en cloruro de metileno anhidro. La disolución se enfrió en un baño de hielo antes de la adición de DIEA (1,4 ml, 8 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda una noche. Se añadió bicarbonato de sodio saturado, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Las partes orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. El producto en bruto (2,11 g) se purificó mediante cromatografía (Biotage® Flash 40S, 95:5 EtOAc:MeOH) proporcionando el compuesto del título en forma de espuma rosa claro (1,06 g, 92%). MS m/z 287,3 (MH⁺).

Preparación 6

Éster *terc*-butílico del ácido (S)-2-((S)-3-fluoro-pirrolidina-1-carbonil)-4-oxo-pirrolidina-1-carboxílico

Se mezclaron N-*terc*-boc-4-oxo-L-prolina (2,29 g, 10 mmol), clorhidrato de (S)-3-fluoropirrolidina (1,38 g, 11 mmol) y TEA (2,09 ml, 15 mmol) en cloruro de metileno anhidro (30 ml) bajo nitrógeno. Se añadió HOBt (2,03 g, 15 mmol) y la mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo antes de la adición de EDC (2,10 g, 11 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda una noche. La mezcla se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. El producto en bruto (3,15 g) se recristalizó a partir de hexano:EtOAc (2:1) dando el compuesto del título en forma de agujas de color amarillo claro (2,18 g, 73%). MS m/z 301,3 (MH⁺).

Preparación 7

Éster *terc*-butílico del ácido (2S,4S)-2-(3,3-difluoro-pirrolidina-1-carbonil)-4-piperazin-1-il-pirrolidina-1-carboxílico

Etapa 1

Éster bencílico del ácido 4-[(3S,5S)-1-*terc*-butoxicarbonil-5-(3,3-difluoro-pirrolidina-1-carbonil)-pirrolidin-3-il]-piperazina-1-carboxílico

A una disolución del compuesto del título de la preparación 1 (1,59 g, 5 mmol) y 1-(benciloxicarbonil)piperazina (1,21 g, 5,5 mmol) en 1,2-dicloroetano (20 ml) se añadieron AcOH (0,3 ml, 1,05 equivalentes), seguidos por triacetoxiborohidruro de sodio (2,119 g, 10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió bicarbonato de sodio saturado y el producto se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. Después de la evaporación, el producto en bruto (2,28 g de espuma amarilla) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc dando el compuesto del título en forma de espuma blanca (1,28 g, 49%). MS m/z 532,3 (MH⁺).

Etapa 2

El producto de la etapa 1 (1 g, 1,91 mmol) se disolvió en EtOH (50 ml) y se añadieron cuidadosamente Pd al 10%/C (1 g, 1 equivalente p/p), seguido por 1,4-ciclohexadieno (1,81 ml, 10 equiv.). La mezcla se agitó suavemente en un matraz herméticamente cerrado a temperatura ambiente durante toda una noche. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas y se concentró dando el producto como un semisólido amarillo (758 mg, 100%). MS m/z 389,4 (MH⁺).

Preparación 8

Éster *terc*-butílico del ácido (S)-2-(3,3-difluoroazetidina-1-carbonil)-4-oxo-pirrolidina-1-carboxílico

Se mezclaron N-*terc*-BOC-4-oxo-L-prolina (458 mg, 2 mmol), clorhidrato de 3,3-difluoroazetidina (258 mg, 2 mmol) (preparado como se describe en el documento WO 2000/47582), y DIPEA (0,35 ml, 2 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 ml) y se enfriaron a 0°C. Se añadió después HOBt (405 mg, 3 mmol) en una porción seguido por clorhidrato de EDC (422 mg, 2,2 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda una noche. Se añadió bicarbonato de sodio saturado, la fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Los extractos orgánicos combinados se lavaron dos veces con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y concentraron. El producto en bruto (570 mg) se trituró con hexanos:cloruro de metileno (10:1), se filtró, y se secó en un horno al vacío produciendo 510 mg (rendimiento del 84%) del producto título como un polvo naranja claro. MS (m/z): 305,1 (MH⁺).

ES 2 327 857 T3

Preparación 9

Clorhidrato de (2S,4S)-4-fluoropirrolidina-2-carbonitrilo

5 Etapa 1

Éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) éster 2-terc-butílico del ácido (2S,4S)-4-fluoropirrolidina-1,2-dicarboxílico

10 Se añadió a 0°C en una porción N-hidroxisuccinimida (380 mg, 3,3 mmol) a una disolución de N-terc-BOC-cis-4-fluoro-L-prolina (700 mg, 3 mmol) en DMF anhidra (8 ml), seguida por 1,3-diisopropilcarbodiimida (391 mg, 3,1 mmol) en pequeñas partes. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda una noche. La mezcla se diluyó con 100 ml de agua, el precipitado se recogió, se lavó con agua fría, y se secó en un horno al vacío durante toda una noche. El producto (1,093 g) se usó sin purificación adicional. MS m/z 331,3 (MH⁺).

15 Etapa 2

Éster terc-butílico del ácido (2S,4S)-2-carbamoyl-4-fluoro-pirrolidina-1-carboxílico

20 El compuesto del título de la etapa 1 (1,03 g, 3,12 mmol) se disolvió en dioxano (12 ml) a temperatura ambiente y la disolución se trató con hidróxido de amonio acuoso concentrado (10 mmol) gota a gota. La disolución espesa resultante se agitó a temperatura ambiente durante tres horas, después se acidificó con HCl 6N a pH 4-5, y se extrajo con cloruro de metileno (2x). Los extractos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron proporcionando 562 mg (rendimiento del 78%) de una aceite transparente. MS m/z 233,3 (MH⁺).

25 Etapa 3

Éster terc-butílico del ácido (2S,4S)-2-ciano-4-fluoro-pirrolidina-1-carboxílico

30 Se añadió una disolución de TFAA en 2 ml de cloruro de metileno bajo nitrógeno a una disolución del compuesto del título de la etapa 2 (550 mg, 2,37 mmol) y piridina seca (0,4 ml, 2 equiv.) en cloruro de metileno anhidro (15 ml) a 0°C. La disolución se agitó a 0°C durante dos horas y después a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice dando 458 mg (rendimiento del 90%) de un aceite que solidificó al reposar. MS m/z 215,3 (MH⁺).

35 Etapa 4

40 El compuesto del título de la etapa 3 (400 mg) se disolvió en acetonitrilo seco (8 ml) y se añadieron 0,5 ml de HCl 4 N en dioxano bajo nitrógeno. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda una noche y el precipitado blanco que se formó se filtró y secó en un horno al vacío produciendo 128 mg (rendimiento del 46%) del compuesto del título. MS m/z 115,1 (MH⁺). El producto adicional se pudo obtener a partir del filtrado.

45 Preparación 10

Clorhidrato de (2S)-4,4-difluoropirrolidina-2-carbonitrilo

50 Etapa 1

N-terc-BOC-4,4-difluoropirrolidina-2-carbonitrilo

55 Se añadió una disolución de TFAA (252 mg, 1,2 equiv.) en 1 ml de cloruro de metileno anhidro a una disolución de amida de N-terc-BOC-4,4-difluoropirrolidina-L-prolina (250 mg, 1 mmol) y piridina seca (97 µl, 1,2 equiv.) en cloruro de metileno anhidro a 0°C. La disolución se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 36 horas. La reacción se desactivó con cloruro de amonio saturado, la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 1N, bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró proporcionando 252 mg de un semisólido blanco. MS m/z 233,1 (MH⁺).

60 Etapa 2

65 El compuesto del título de la etapa 1 (245 mg) se disolvió en acetonitrilo seco (10 ml) y se añadieron 0,5 ml de HCl 4N. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante cinco horas y los disolventes se eliminaron. El residuo se trituró con EtOAc, el sólido se filtró, y después se secó bajo condiciones de alto vacío proporcionando 105 mg (rendimiento del 59%) del compuesto del título como un sólido blanco. MS m/z 133,2 (MH⁺).

Los compuestos de fórmula (I), los estereoisómeros de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos y estereoisómeros, se pueden preparar como se describe en los siguientes ejemplos. Los compuestos de base libre de la presente invención se pueden obtener a partir de sus formas de sal por medios convencionales tales como los descritos en el ejemplo 113, en el presente documento.

Ejemplo 1

(No forma parte de la invención)

Diclorhidrato de ((2S,4S)-4-(4-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-metanona

Etapla 1

*(2S,4S)-2-[(3,3-difluoropirrolidin-1-il)carbonil]-4-{4-[3-(trifluorometil)fenil]piperazina-1-il}pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo*

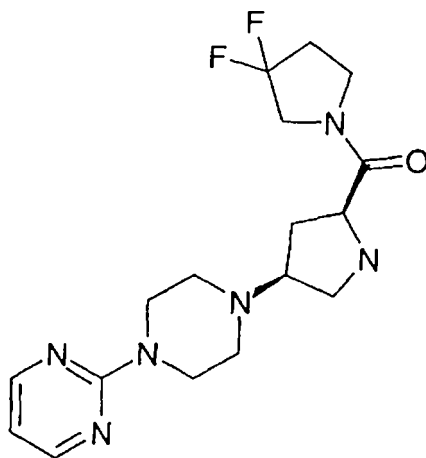
El compuesto del título de la preparación 1 (96 mg, 0,3 mmol), 1-[3-(trifluorometil)fenil]piperazina (70 mg, 0,3 mmol) y AcOH (18 μ l, 0,3 mmol) se disolvieron en 8 ml de 1,2-dicloroetano anhidro. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (127 mg, 0,6 mmol). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, la reacción se desactivó con bicarbonato de sodio saturado, se extrajo con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía (Biotage® Flash 40S, 95:5 diclorometano:MeOH) proporcionando 126 mg (79%) del compuesto del título en forma de una espuma blanca. MS m/z 533 (MH⁺).

Etapla 2

El producto de la etapa 1 (120 mg, 0,225 mmol) se trató con HCl 4N en dioxano (5 ml). Después de dos horas a temperatura ambiente, la mezcla se concentró hasta sequedad, se trituró con éter, se filtró, y se secó al vacío proporcionando 92 mg del compuesto del título como un sólido blanco. MS m/s 433 (MH⁺).

Ejemplo 113

(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-((2S,4S)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)-metanona



Etapla 1

*Éster *tert*-butílico del ácido (S)-2-(3,3-difluoro-pirrolidina-1-carbonil)-4-oxo-pirrolidina-1-carboxílico*

Se cargó éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-4-oxo-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (6,6 kg, 1,0 equivalente) en un reactor, seguido por adición de diclorometano (15 volúmenes). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C. Se añadió trietilamina (4,82 litros, 1,2 equiv.) durante 30 minutos. La mezcla se transformó de suspensión a una disolución transparente al final de la adición de trietilamina. La mezcla se mantuvo a 0°C-5°C durante 10 minutos. El cloruro de pivalóilo (3,65 kg, 1,05 equivalentes) se añadió lentamente mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0°C-5°C. La mezcla de reacción se volvió de nuevo una suspensión. Se tomaron muestras de la mezcla de reacción para controlar el final de la reacción mediante HPLC (usando dietilamina para derivatizar) después de mantenerla durante 1 hora a 0°C-5°C. Se cargó clorhidrato de 3,3-difluoropirrolidina (4,13 kg, 1,0 equivalente) a la mezcla anteriormente mencionada durante 10 minutos a -10°C-0°C. Se introdujo lentamente trietilamina (4,0 litros, 1,0 equiv.) durante 70 minutos a -10°C-0°C. Tras la completación de la adición de trietilamina, la mezcla se agitó durante 1 hora a 0-5°C. La reacción

ES 2 327 857 T3

se completó según ensayo de HPLC (~1% del material de partida). La reacción se desactivó con agua (10 volúmenes) a 0°C-5°C. La mezcla se calentó a 20°C-25°C. Las fases se separaron, y la fase orgánica se lavó con HCl 0,5 M (5 volúmenes). La fase orgánica se lavó de nuevo con NaHCO₃ al 5% combinado (2 volúmenes) y disolución de salmuera semisaturada (1,64 M, 3 volúmenes). La disolución orgánica se concentró atmosféricamente a un volumen poco agitable (aproximadamente 20 litros). Se añadió acetato de etilo (12,6 volúmenes, 82,8 litros), la disolución se concentró atmosféricamente a ~6 volúmenes. La mezcla se mantuvo a 60°C-65°C durante 2 horas y se enfrió a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla mantuvo a 20°C-25°C durante 8 horas. Se añadió heptano (8 volúmenes), y la mezcla se granuló durante un mínimo de 2 horas. Se filtró el sólido, se aclaró con 2:1 heptano/acetato de etilo (1 volumen), y se secó en una bandeja de secado a 25°C-35°C durante un mínimo de 12 horas. Rendimiento: 7,26 kg, 79%. Pureza de HPLC: 99,7%. Las aguas madres (86 litros) se concentraron a 12 litros a vacío parcial a 65°C-70°C. La mezcla se enfrió a 60°C-65°C. Se añadió lentamente acetato de etilo (4,0 litros) durante 15 minutos. La mezcla se enfrió a 20°C-25°C durante 2 horas y se mantuvo a esa temperatura durante al menos 2 horas. El sólido se filtró y se aclaró con heptano/acetato de etilo (3:1 v/v, 1,7 litros). El secado en una bandeja de secado durante 12 horas a 35°C-45°C produjo 435 gramos de producto. Pureza de HPLC: 96,4%.

Etapa 2

Éster terc-butílico del ácido (2S,4S)-2-(3,3-difluoro-pirrolidina-1-carbonil)-4-(4-pirimidin-2-il-piperazin-1-il)-pirrolidina-1-carboxílico

Un reactor se cargó con THF (20 volúmenes), 2-piperazin-1-il-pirimidina (2,17 kg, 1,05 equivalentes) y el producto de la etapa 1 (4,00 kg, 1,0 equivalente). La mezcla se mantuvo a 20°C-25°C hasta que todo el material se disolvió durante 30 minutos. Se añadió ácido acético (0,792 kg, 1,05 equivalentes). La mezcla se agitó durante 1 hora durante la cual la mezcla de reacción se vuelve turbia. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 30 minutos y después se concentró a 60°C-70°C hasta que una temperatura estable de 66,9°C se observó en términos generales indicando la completa eliminación de agua del sistema. Se añadió más THF según se necesitó. Al final, se añadió THF para llevar el volumen total en el reactor a 15 volúmenes del reactivo límite. La mezcla de reacción se enfrió a -3°C-7°C y se tomaron muestras para controlar la formación completa de imina mediante HPLC (usando triacetoxiborohidruro de sodio para reducir imina). Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (5,33 kg, 2,0 equivalentes) por partes a la suspensión a -5°C-15°C. La mezcla de reacción se calentó a 20°C-25°C y se mantuvo durante 12 horas. Los resultados de HPLC confirmaron que la reacción se completó al 99,8%. Se añadió la disolución acuosa de bicarbonato de sodio (10% p/p, 10 volúmenes). La suspensión se concentró para eliminar 10 volúmenes de THF a vacío parcial a 30°C-60°C. Se añadió acetato de etilo (10 volúmenes) a la suspensión después de que esta se enfriara a 20°C-25°C. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se comprobó mediante HPLC. Contenía menos del 2% del producto. La fase orgánica se lavó con agua (5 volúmenes), disolución saturada de salmuera (5 volúmenes) y se concentró a un volumen pequeño (2 volúmenes) bajo vacío parcial a 45°C-50°C. A la suspensión se añadió heptano (10 volúmenes) a 45°C-50°C durante 30 minutos. La mezcla se enfrió a 20°C-25°C y se granuló durante 2 horas. El sólido se recogió mediante filtración, se aclaró con heptano (2 volúmenes). El secado en una bandeja de secado durante 12 horas a 35°C-45°C produjo 5,35 kg (91,3%) del producto.

Etapa 3

(3,3-difluoro-pirrolidin-1-il)-[(2S,4S)-4-(4-pirimidin-2-il-piperazin-1-il)-pirrolidin-2-il]-metanona

Se cargó agua (19 litros, 2 volúmenes) a un reactor seguido por el producto de la etapa 2 (9,57 kg, 1,0 equivalentes). Se añadió a una suspensión HCl concentrado (37% en peso en agua, 19,1 litros, 2 volúmenes) lentamente a 20°C-30°C durante 4 horas. La suspensión se convirtió en disolución después de que se añadieran 12 l de HCl. Después de completar la adición, la reacción se completó según un ensayo de HPLC. La mezcla de reacción se enfrió a 5°C-15°C. A la mezcla se añadió una disolución acuosa de NaOH al 50% lentamente con agitación a pH 10-pH 11. El pH se controló muy de cerca con un pHmetro durante la neutralización. El volumen total del NaOH al 50% añadido fue de 12,45 litros. La mezcla se calentó a 20-25°C y se extrajo dos veces con acetato de etilo (115 litros, 12 volúmenes y 57 litros, 6 volúmenes, respectivamente). La muestra de la fase acuosa después de la segunda extracción se analizó mediante HPLC y mostró sólo un 1% del producto en esa disolución acuosa. Las fases orgánicas se combinaron y trataron con sulfato de magnesio (5 kg) durante 1 hora. La mezcla se filtró. La torta del filtro se aclaró con acetato de etilo (10 litros). El filtrado se cargó de nuevo en el reactor por medio de un filtro de 0,2 micrones en línea para una operación libre de partículas. (Las siguientes operaciones se llevaron a cabo bajo condiciones libres de partículas). La disolución se concentró a 20 litros (2 volúmenes) bajo vacío parcial a 50°C-60°C. La mezcla se enfrió a 20°C-25°C durante 30 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, ocurre la cristalización. La mezcla se mantuvo durante 30 minutos. Se añadieron hexanos (20 litros, 2 volúmenes) lentamente durante 1 hora. La mezcla se granuló durante 2 horas. El producto sólido se recogió por filtración y se aclaró con hexanos/acetato de etilo (10 litros, 1:1 v/v). El filtro se secó mediante una corriente de nitrógeno durante un mínimo de 2 horas. El producto se secó en una bandeja de secado a 44°C durante 12 horas. Rendimiento: 5,7 kg, 75,9%. P.f.: 156°C. MS m/z 367 (MH⁺). RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ 8,15 (d, 2H, J = 5,0 Hz, CH de pirimidina), 6,55 (t, 1H, J = 4,8 Hz, CH de pirimidina), 3,87-3,81 (dd, 1H, H_{2b} de prolina, rotámera), 3,78-3,50 (m, 4H, N-CH₂ de pirrolidina), 3,55-3,40 (m, 4H, N-CH₂ de piperazina), 2,97 (dd, 1H, J = 10,2, 6,6 Hz, H_{5a} de prolina), 2,85-2,75 (m, 1H, H_{4b} de prolina), 2,69 (dd, 1H, J = 10,0, 9,1 Hz, H_{5b} de prolina), 2,55-2,20 (m, 7H, solapamiento de N-CH₂ de piperazina, CH₂ de pirrolidina y H_{3b} de prolina), 1,47-1,38 (m, 1H, H_{3a} de prolina).

Alternativamente, la sal diclorhidrato del compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

Metodologías biológicas

La utilidad de los compuestos de la invención, los profármacos y estereoisómeros de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, profármacos, y estereoisómeros, en el tratamiento o prevención de las afecciones enumeradas anteriormente en el presente documento en mamíferos puede demostrarse en ensayos convencionales conocidos para alguien de habilidad normal en la técnica relevante, incluyendo los ensayos *in vivo* e *in vitro* descritos más adelante. Tales ensayos proporcionan también medios por los cuales las actividades de los compuestos de la invención, los profármacos, y estereoisómeros de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, profármacos, y estereoisómeros, se pueden comparar con las actividades de otros compuestos.

Ensayo *in vitro* para la inhibición de DPP-IV

La inhibición de DPP-IV se puede demostrar *in vitro* mediante el siguiente ensayo, el cual se adapta a partir de los procedimientos de Scharpe, y col., A. Clin. Chem., 2299 (1988) y Lodja, Z. Czechoslovak Medicine, 181 (1988). Se pipetea 150 μ l de una disolución enzima-sustrato en pocillos de microtitulación de una placa de 96 pocillos de poliestireno, y se mantuvieron a 4°C. La disolución enzima-sustrato comprende clorhidrato de Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida 50 μ M en un tampón de ensayo de Tris 50 mM de pH 7,3 que contiene cloruro de sodio 0,1 M, 0,1% de Tritón (v/v), y DPP-IV 50 μ U/ml (MP Biomedicals, Livermore, CA; disolución madre de DPP-IV 5 mU/ml). Se añadieron 5 μ l del compuesto de fórmula (I) por pocillo, llevando las concentraciones finales del compuesto de la fórmula (I) a entre 3 μ M y 10 nM por pocillo. *Controles.* La enzima se omite de cuatro (4) pocillos, como un blanco de reactivo. Se añaden 5 μ l de Diprotin A 3 mM (Bachem Bioscience, Inc.; King of Prussia, PA) a cuatro pocillos como un control de calidad positivo, proporcionando una concentración final de Diprotin A 100 μ M. Para medir la actividad total de la enzima (es decir, un control negativo), sin la influencia de cualesquiera compuestos de fórmula (I), se añaden 5 μ l de agua destilada a cuatro pocillos.

El ensayo completo se incubó durante toda una noche (entre 14 y 18 horas) a 37°C. La reacción se desactivó añadiendo 10 μ l de disolución Fast Blue B (0,5 mg/ml de Fast Blue B), en un tampón que comprende acetato de sodio 0,1 M de pH 4,2 y Tritón X-100 al 10% (v/v), a cada pocillo, seguido por agitación durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Las placas se pueden analizar en un espectrofotómetro Spectramax (Molecular Devices; Sunnyvale, CA), o equipamiento equivalente, (absorción máxima a 525 nm). Los datos de CI_{50} para los compuestos se pueden obtener midiendo la actividad de DPP-IV en un intervalo de concentraciones del compuesto de 10 nM a 3 μ M.

Ensayo *in vivo* para el descenso de glucosa

Los efectos del descenso de glucosa de los inhibidores DPP-IV, incluyendo los compuestos de fórmula (I), se pueden ejemplificar en ratones KK/HIJ de 4-6 semanas de edad (Jackson Labs; Bar Harbor, ME) en el contexto de una prueba de tolerancia a glucosa oral.

Las pruebas de tolerancia a glucosa orales (OGTT) se han usado en humanos desde, al menos, los años 30, como se describe por Pincus, y col., Am. J. Med. Sci., 782 (1934) y se usan rutinariamente en la diagnosis de la diabetes humana, aunque no para evaluar la eficacia de los agentes terapéuticos en pacientes.

Los ratones KK se han usado para evaluar (i) glitazonas (Fujita y col., Diabetes, 804 (1983); Fujiwara, y col., Diabetes, 1549 (1988); e Izumi, y col., Biopharm Drug. Dispos., 247 (1997); (ii) metformina (Reddi, y col., Diabet. Metabol., 44 (1993)); (iii) inhibidores de glucosidasa (Hamada, y col., Jap. Pharmacol. Ther., 17 (1988) y Matsuo y col., Am. J. Clin. Nutr., 314S (1992)), y (iv) efectos extrapancreáticos de sulfonilureas (Kameda, y col., Arzneim. Forsch./Drug Res., 39044 (1982) y Muller y col., Horm. Metabl. Res., 469 (1990)).

Los ratones KK se derivan de una línea genética establecida y descrita primero por Kondo, y col., Bull. Exp. Anim., 107 (1957). Estos ratones desarrollan espontáneamente una forma hereditaria de diabetes poligénica que progresa hasta causar complicaciones renales, retinales, y complicaciones neurológicas análogas a aquellas vistas en sujetos humanos diabéticos, sin embargo, no requieren insulina u otra medicación para sobrevivir.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de ratones KK para evaluar los efectos de los agentes secretagogos de insulina en el contexto de una prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los ratones se mantienen en ayuno durante toda una noche (de aproximadamente 14 a aproximadamente 18 horas), pero se les permitió el acceso libre a agua. Después de ayunar, (tiempo "t" = 0), se toman 25 μ l de sangre del seno retroorbital y se añaden a disolución salina heparinizada al 0,025% (100 μ l) en hielo. A los ratones (10 por grupo) se les administra después oralmente una disolución de un compuesto de fórmula (I) en metilcelulosa al 0,5% (0,2 ml/ratón). Dos grupos control reciben sólo metilcelulosa al 0,5%. A t = 15 minutos, a los ratones se les extrae sangre, como se describe anteriormente, y después se les administra dosis de 1 mg/kg de glucosa en agua destilada (0,2 ml/ratón). Al primer grupo control se le administra glucosa. Al segundo grupo control se le administra agua. A t = 45 minutos, a los ratones se les extrae sangre otra vez, como se describió anteriormente. Las muestras de sangre se centrifugaron, el plasma se recogió y analizó su contenido en glucosa en un analizador de glucosa Roche-Hitachi 912 (Roche Diagnostics Corp; Indianápolis, IN). Los datos se

pueden expresar como porcentaje (%) de inhibición de desviación de glucosa relativa a los dos grupos control (es decir, representando el nivel de glucosa en los animales que reciben glucosa pero no compuesto de ensayo el 0% de inhibición y representando la concentración de glucosa en los animales que reciben sólo agua el 100% de inhibición).

Los compuestos de fórmula (I) exhiben generalmente actividad inhibitoria, expresada como valores de CI_{50} , frente a DPP-IV, que son < 1.000 nM. Generalmente los compuestos preferidos tienen valores de $CI_{50} < 100$ nM. Por ejemplo, diclorhidrato de ((2*S*,4*S*)-4-(4-(3-cianopirazin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)-((3*R**,4*S**)-3,4-difluoropirrolidin-1-il)-metanona tiene un CI_{50} de 3,5 nM.

Experimentos farmacocinéticos en ratas comparativos

Los experimentos farmacocinéticos en rata se llevaron a cabo para demostrar el incremento en las concentraciones en plasma mantenidas a lo largo del tiempo para un compuesto de la presente invención según se compara a un compuesto de la técnica previa estructuralmente similar descrito genéricamente en la solicitud internacional WO 02/14271. Específicamente, las concentraciones en plasma se miden a lo largo del tiempo para ratas a las que se ha administrado (a) la sal diclorhidrato de (3,3-difluoropirrolidin-1-il)- ((2*S*,4*S*)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)-metanona (de ahora en adelante "CPD 113"), la cual se preparó como se describe en el ejemplo 113, y (b) la sal diclorhidrato comparativa de ((2*S*,4*S*)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il(pirrolidin-1-il)metanona (de ahora en adelante "comparador"), el cual se puede preparar de acuerdo al procedimiento del ejemplo 1 o como se describe generalmente en el documento WO 02/14271.

En este experimento, se obtuvieron de los Charles River Laboratories ratas macho Sprage-Dawley (200-250 gramos) con cánulas implantadas en la vena yugular (JVC). Cada compuesto se administró a dos ratas o mediante sonda oral. La dosis oral se administró como una disolución en metilcelulosa al 0,5% con un volumen de dosis de 10 ml/kg. La cantidad de cada compuesto administrado fue de 5 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre (0,25 ml) se recogieron en múltiples momentos desde 0 a 24 horas y se situaron en tubos que contenían heparina de litio (Becton Dickinson, Microtrainer®). Las muestras de sangre se centrifugaron después a 12000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron alícuotas de plasma para la determinación de concentraciones en plasma del compuesto (ensayos farmacocinéticos). Las muestras de plasma se congelaron a -70°C hasta su análisis.

Las muestras de plasma de ratas se analizaron respecto a sus concentraciones de compuesto mediante LC/MS/MS (espectrómetro de masas de Applied Biosystems API 4000). En breve, las curvas patrón de compuesto se prepararon en plasma de rata control con un intervalo dinámico de 1,0-2000 ng/ml. Alícuotas (0,02 ml) de ambos patrón y muestras se situaron en tubos Marsh™ en un bloque de 96 pocillos. Las proteínas se precipitaron mediante adición de 0,1 ml de acetonitrilo que contenía 0,1 µg/ml de patrón interno. Los bloques de 96 pocillos se agitaron en vórtex y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se eliminó y se situó en un nuevo bloque de 96 pocillos y se llevó a sequedad a 50°C bajo una corriente de nitrógeno. Los residuos se reconstituyeron en fase móvil (acetato de amonio 5 mM al 60% y acetonitrilo al 40%). Se inyectaron después alícuotas (0,01 ml) en el LC/MS/MS para análisis.

Las concentraciones promedio en plasma medidas se proporcionan en la siguiente tabla.

Compuesto/Tiempo (horas)	CPD 113 Nivel Promedio en Plasma ng/ml	Desviación estándar	Comparador Nivel Promedio en Plasma ng/ml	Desviación estándar
0,25	1406,0	338,0	446	71,1
0,5	1322,5	359,9	425	108
0,75	979,2	137,0	319	59,8
1	768,2	314,0	283	13,3
2	289,2	71,8	128	40,4
4	97,8	69,2	27,3	11,2
6	49,3	19,1	12,7	1,2
8	32,8	25,5	6,16	2,62

Como se muestra mediante sus respectivas concentraciones en plasma, CPD 113 alcanzó y mantuvo concentraciones significativamente mayores en el plasma que el compuesto comparador.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es 3,3-difluoropirrolidin-1-il)-((2S,4S)-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)pirrolidin-2-il)metanona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto; y

(b) un transportador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una afección mediada por la dipeptidilpeptidasa-IV en un mamífero.

4. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para tratar la afección mediada por la dipeptidilpeptidasa-IV en un mamífero.

5. El compuesto de la reivindicación 3 o el uso de la reivindicación 4, en el que la afección es diabetes de tipo 2; diabetes de tipo 1, tolerancia a glucosa alterada, hiperglucemia, síndrome metabólico (síndrome X y/o síndrome de resistencia a insulina), glucosuria, acidosis metabólica, artritis, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, cardiomiopatía diabética, obesidad, afecciones exacerbadas por obesidad, hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis, osteoporosis, osteopenia, fragilidad, pérdida de hueso, fractura de hueso, síndrome coronario agudo, baja estatura debida a deficiencia en la hormona del crecimiento, infertilidad debida al síndrome ovárico poliquístico, ansiedad, depresión, insomnio, fatiga crónica, epilepsia, trastornos de la alimentación, dolor crónico, adicción al alcohol, enfermedades asociadas con motilidad intestinal, úlceras, síndrome del intestino irritable, síndrome del intestino inflamatorio; síndrome del intestino corto; y la prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

6. El compuesto de la reivindicación 3 o el uso de la reivindicación 4, en el que la afección es diabetes, preferiblemente diabetes de tipo 2.

7. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un segundo compuesto que es un agente antidiabético seleccionado de insulina y análogos de insulina; insulinitropina; biguanidas; α_2 -antagonistas e imidazolinas; glitazonas; inhibidores de aldosa reductasa; inhibidores de glucógeno fosforilasa; inhibidores de sorbitol deshidrogenasa; inhibidores de oxidación de ácidos grasos; inhibidores de α -glucosidasa; β -agonistas; inhibidores de fosfodiesterasa; agentes que disminuyen los lípidos; agentes antiobesidad; vanadato y complejos de vanadio y complejos de peroxovanadio; antagonistas de amilina; antagonistas de glucagón; secretagogos de hormona del crecimiento; inhibidores de gluconeogénesis; análogos de somatostatina; agentes antilipolíticos; un profármaco de agentes antidiabéticos; o una sal farmacéuticamente aceptable de los agentes antidiabéticos.