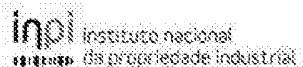


---

(11) Número de Publicação: **PT 2142519 E**



(51) Classificação Internacional:

**C07D 241/08** (2014.01) **A61K 31/4704**

(2014.01)

**A61P 3/10** (2014.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2008.04.18**

(30) Prioridade(s): **2007.04.19 KR 20070038462**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.01.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.09.24  
237/2014**

(73) Titular(es):

**DONG-A PHARM.CO., LTD.**

**252 YONGDU-DONG DONGDAEMUN-GU  
SEOUL 130-823**

**KR**

(72) Inventor(es):

**HEUNG JAE KIM**

**KR**

**WOO YOUNG KWAK**

**KR**

**CHANG YELL SHIN\***

**KR**

**HADONG KIM**

**KR**

**JONG PIL MIN**

**KR**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO**

**PT**

**RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA**

(54) Epígrafe: **INIBIDOR DE DPP-IV INCLUINDO GRUPO BETA-AMINO, O SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O MESMO, PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DIABETES OU OBESIDADE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM NOVO COMPOSTO HETEROCÍCLICO CONTENDO UM GRUPO BETA-AMINO, UM MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O MESMO COMPOSTO HETEROCÍCLICO OU UM SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL COMO UM INGREDIENTE ACTIVO. O COMPOSTO HETEROCÍCLICO DA PRESENTE INVENÇÃO APRESENTA EXCELENTE ACTIVIDADE INIBITÓRIA DE DPP-IV E BIODISPONIBILIDADE E, POR ESSE MOTIVO, PODE SER ÚTIL PARA A PROFILAXIA OU TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A DPP-IV, TAIS COMO DIABETES OU OBESIDADE.

## RESUMO

### **"INIBIDOR DE DPP-IV INCLUINDO GRUPO BETA-AMINO, O SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O MESMO, PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DIABETES OU OBESIDADE"**

A presente invenção proporciona um novo composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino, um método para preparar o mesmo e uma composição farmacêutica compreendendo o mesmo composto heterocíclico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo. O composto heterocíclico da presente invenção apresenta excelente actividade inibitória de DPP-IV e biodisponibilidade e, por esse motivo, pode ser útil para a profilaxia ou tratamento de doenças relacionadas com a DPP-IV, tais como diabetes ou obesidade.

## **DESCRICAÇÃO**

**"INIBIDOR DE DPP-IV INCLUINDO GRUPO BETA-AMINO, O SEU MÉTODO DE  
PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O MESMO, PARA  
PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DIABETES OU OBESIDADE"**

### **CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção refere-se a um composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino, o qual tem excelente actividade inibitória na dipeptidil peptidase IV (aqui a seguir referida como "DPP-IV") e elevada biodisponibilidade, e uma composição farmacêutica compreendendo o mesmo composto heterocíclico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo.

### **TÉCNICA ANTECEDENTE**

A enzima dipeptidil peptidase IV, aqui abreviada como DPP-IV (e em outros locais como DP-IV, DP-4 ou DAP-IV) e também conhecida pela classificação EC. 3. 4. 14. 5, é uma protease de serina (Barrett A. J. et al., Arch. Biochem. Biophys., 1995, 247-250), a qual cliva o dipéptido N-terminal dos péptidos que iniciam com a sequência H-Xaa-Pro-Y ou H-Xaa-Ala-Y, em que Xaa representa qualquer aminoácido lipofílico, Pro representa prolina e Ala representa alanina (Heins J., et al., Biochim. et Biophys. Acta 1988, 161). A DPP-IV está amplamente distribuída e é encontrada em vários tecidos de mamíferos, tais como rim, fígado e intestino delgado (Hegen M. et al., J. Immunol., 1990, 2908-2914). A DPP-IV foi identificada em primeiro lugar como uma

proteína de ligação à membrana. Mais recentemente, foi identificada uma forma solúvel (Duke-Cohan J. S. et al., J. Biol. Chem., 1995, 14107-14114). De acordo com o estudo recentemente publicado e referido, foi revelado que essa forma solúvel da DPP-IV tem a mesma estrutura e função que a forma de ligação à membrana da enzima e encontra-se sem um determinado domínio de ligação à membrana no sangue (Christine D. et. al, Eur. J. Biochem., 2000, 5608-5613).

O interesse inicial na DPP-IV focou-se no seu papel na activação de linfócitos T. A DPP-IV responsável pela activação de linfócitos T foi especificamente designada como CD26. Com o relatório que mostra que a CD26 se liga ou interage com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Guteil W. G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 6594-6598), foi proposto que os inibidores de DPP-IV possam ser úteis no tratamento de SIDA (Doreen M. A. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 2745-2748).

Além de um papel essencial da participação no sistema imunitário, a principal função de DPP-IV deriva da sua actividade peptidolítica, como descrito acima. Foi dada particular atenção ao papel da DPP-IV, uma vez que se verificou que a DPP-IV é uma enzima chave implicada na degradação de proteína 1 semelhante a glucagon (aqui a seguir referida como "GLP-1") no intestino delgado (Mentlein R. et al., Eur. J. Biochem., 1993, 829-835). A GLP-1 é a hormona peptídica de 30 aminoácidos, a qual é segregada por células L do intestino como uma resposta do intestino delgado à ingestão de alimentos (Goke R. et al., J. Biol. Chem., 1993, 19650-19655). Uma vez que a GLP-1 é conhecida por ter efeitos potenciadores da acção de insulina no controlo de níveis de glucose no sangue

pós-prandiais (Holst J. J. et al., Diabetes Care, 1996, 580-586), foi postulado que os inibidores de DPP-IV também podem ser empregues, de modo útil, no tratamento de diabetes tipo 2. Com base nesta assumpção, foi desenvolvida uma forma inicial do inibidor de DPP-IV, com alguns relatórios a demonstrar a eficácia terapêutica de um medicamento em experiências animais (Pauly R. P. et al., Metabolism, 1999, 385-389). Além disso, os murganhos ou ratos deficientes em DPP-IV mantiveram a actividade de GLP-1 e elevados níveis de insulina, resultando na diminuição dos níveis de glucose no sangue e essa disruptão ou mutação genética do gene de DPP-IV não apresentou efeito significativo na sobrevivência de animais individuais (Marguet D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 6874-6879). Como uma consequência, foi proposto que a DPP-IV é exequível como um potente agente terapêutico para o tratamento de diabetes tipo 2, o que resultou na aceleração da pesquisa e desenvolvimento do inibidor de DPP-IV.

A ligação de GLP-1 com um receptor, em vários tecidos, resulta em saciedade (sensações de satisfação), retardamento do esvaziamento gástrico e crescimento facilitado de células beta pancreáticas. Por esse motivo, os ensaios clínicos para o tratamento de diabetes tipo 2 têm aumentado gradualmente, através de administração intravenosa de GLP-1 *per se* (Verdich C. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, 4382-4389). Uma semi-vida *in vivo* de GLP-1 é meramente de 2 min (Kieffer T. J., et al., Endocrinology, 1995, 3585-3596), de modo que essa curta semi-vida é um obstáculo muito importante para dirigir a utilização de GLP-1 como um agente terapêutico. Desde então, numerosos grupos de pesquisa e instituições fizeram muitas tentativas em relação à derivatização de GLP-1, resultando no desenvolvimento e comercialização de um péptido que é capaz de

prolongar a curta semi-vida *in vivo* (Deacon C. F., Diabetes, 2004, 2181-2189). Contudo, esse derivado de GLP-1 ainda sofre de uma limitação fundamental, na medida em que é uma formulação injectável. Além disso, tem sido cada vez mais focado um grande interesse no desenvolvimento de um inibidor de DPP-IV eficiente, devido ao facto de que a GLP-1 activa (7-36) é degradada por DPP-IV e, depois, convertida numa GLP-1 inactiva (9-36) apenas durante um curto período de tempo, e. g., 2 min.

O início no desenvolvimento de inibidores de DPP-IV foi semelhante à tendência de desenvolvimento de outros inibidores. Isto é, a maioria dos resultados de pesquisa foram para análogos de substrato. Um representativo destes análogos de substrato é um derivado dipeptídico, o qual foi obtido como o produto da pesquisa inicial que foi realizada num núcleo parental possuindo uma estrutura semelhante à da Prolina (Pro), com base no facto de que a DPP-IV apresenta afinidade pronunciada para um péptido contendo um determinado aminoácido Prolina (Chinnaswamy T. et al., J. Biol. Chem., 1990, 1476-1483). Os exemplos típicos de estruturas semelhantes à Prolina incluem pirrolidida e tiazolidida e os derivados que contêm estes compostos de núcleo parental apresentam actividade inibitória reversível e competitiva para a enzima DPP-IV (Augustyns KJL., et al., Eur. J. Med. Chem., 1997, 301-309).

Entre os produtos dessa pesquisa e desenvolvimento extensivos, existiram experiências contínuas no mecanismo de acção e eficácia de determinados compostos, especificamente Val-Pyr (Valina-Pirrolidida), Ile-Thia (Isoleucina-Tiazolidida), e semelhantes. Particularmente, tem sido focada uma grande atenção em Ile-Thia, uma vez que a estrutura Val-Pyr exibiu actividade inibitória relativamente pobre em DPP-IV (Hanne B.

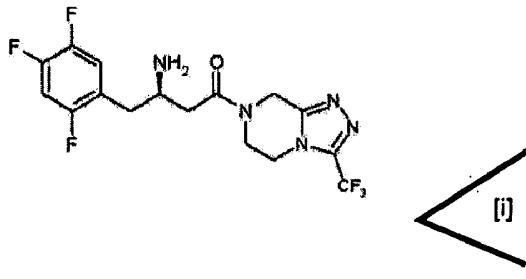
R., et al., Nat. Struct. Biol., 2003, 19-25), que como tal promoveu pesquisa e estudo intensivos em derivados do composto Ile-Thia.

Fora dos compostos derivados de Ile-Thia focados e obtidos pela pesquisa e estudo acima mencionados, um composto possuindo a actividade mais proeminente foi a série de tiazolidida de aminoácidos beta, a qual tentou ser desenvolvida por Merck & Co., Inc. Contudo, de acordo com os resultados de experiências farmacodinâmicas e farmacocinéticas realizados em ratos, o composto obtido apresentou biodisponibilidade significativamente baixa em conjunto com uma limitação aparente na inibição da actividade enzimática (Jinyou Xu, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 4759-4762). Em consequência, o desenvolvimento adicional em compostos desta classe foi descontinuado, devido a profundas desvantagens.

Durante a investigação acima mencionada, a Merck verificou que um aminoácido beta, além de um núcleo parental de tiazolidida, é também um factor chave que possui efeitos significativos na actividade inibitória de DPP-IV. Esta descoberta foi aplicada à abordagem para substituição do núcleo parental de tiazolidida com um diferente composto de núcleo parental (Linda L. B., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 4763-4766). Com essa pesquisa subsequente, foram sintetizados vários derivados que possuem substituição do núcleo parental de tiazolidida com um núcleo parental de piperazina, com teste de eficácia de fármaco e estudos farmacodinâmicos. Infelizmente, os derivados de piperazina da Merck sofreram ainda de biodisponibilidade significativamente baixa. De acordo com a optimização do composto para lidar com essa desvantagem, foi desenvolvido o produto MK-0431 (marca registada: JANUVIA), com

modificação de uma porção de piperazina para uma porção de triazolopiperazina. Este produto é agora comercializado sob nova aprovação de fármaco pela US FDA, em 2006. Além disso, subsequente a MK-0431, está actualmente em desenvolvimento um composto com incorporação de uma porção de diazepanona (anel de sete membros) (documentos WO 2004037169; WO 2005011581; WO 2006104997; e Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 49-52). Particularmente, de acordo com o artigo publicado na revista (Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 49-52), foi demonstrado que a imidazolona (anel de cinco membros) e piperazinona (anel de seis membros) apresentaram actividade *in vitro* notavelmente baixa, quando comparada com a diazepanona, resultando, por este motivo, num foco intensivo na optimização de diazepanona.

[MK-0431]



i: Biftu, Tesfaye et al. (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 17(1), 2006, p. 49-52) divulgaram que (3R)-4-[ (3R)-3-Amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(2,2,2-tri-fluoroetil)-1,4-diazepan-2-ona é um inibidor selectivo da dipeptidil peptidase IV útil para o tratamento de diabetes tipo 2.

Em resultado de vários estudos e experiências extensivos e intensivos para resolver os problemas como descritos acima e para alcançar a optimização de um composto de interesse, a requerente da presente invenção verificou que quando é realizada uma substituição, incluindo um heteroátomo, numa porção de piperazinona, o composto assim modificado não tem apenas excelente actividade inibitória de DPP-IV, mas é também capaz de alcançar biodisponibilidade significativamente melhorada, quando comparado com um inibidor de DPP-IV convencional e, então, ter

êxito na síntese de um novo composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino. A presente invenção foi concluída com base nestas descobertas.

## **DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO**

### **PROBLEMA TÉCNICO**

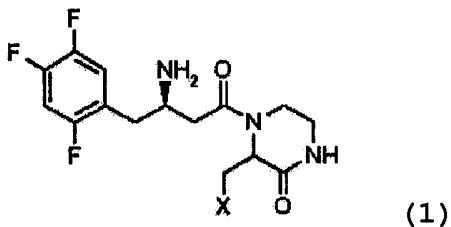
É um objectivo da presente invenção proporcionar um composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino e possuindo actividade inibitória de DPP-IV, ou um seu sal, hidrato ou solvato farmaceuticamente aceitável.

É um outro objectivo da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento de diabetes ou obesidade, compreendendo o composto heterocíclico acima referido, ou um seu sal, hidrato ou solvato farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo.

### **SOLUÇÃO TÉCNICA**

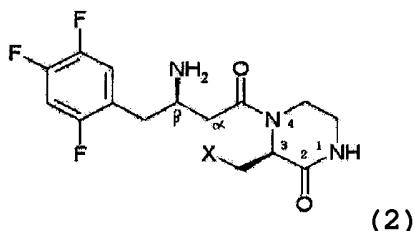
Aqui a seguir, a presente invenção irá ser descrita em maior detalhe.

A presente invenção proporciona compostos heterocíclicos com um grupo beta-amino representado pela Fórmula 1:



em que X é OR<sub>1</sub>, SR<sub>1</sub> ou NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub> e R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> de NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> podem formar um anel de 5 a 7 membros com inclusão de um heteroátomo O; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

De um modo preferido, o composto de Fórmula 1, de acordo com a presente invenção, engloba um composto de Fórmula 2, o qual é um estereoisómero que induz actividade óptica num átomo de carbono na posição 3 de um anel de piperazinona e é representado pela Fórmula 2 abaixo.



em que X é como definido na Fórmula 1.

Isto é, o composto de Fórmula 1 pode ter dois centros assimétricos. Especificamente, o composto de Fórmula 1, como mostrado na Fórmula 2, pode ter dois centros assimétricos no carbono beta e no carbono da posição 3 do anel de piperazinona, de modo que possa estar presente na forma de um diastereoisómero simples, racemato, mistura racémica ou mistura

diastereoisomérica, todos os quais estão no âmbito do composto de Fórmula 1, de acordo com a presente invenção.

Além disso, o composto de Fórmula 1 pode estar parcialmente presente como um tautómero. Também estão incluídos no composto de Fórmula 1 tautômeros individuais, bem como as suas misturas.

A forma estereoisomérica do composto de Fórmula 1 pode ser obtida por síntese estereoselectiva, de acordo com um método convencional conhecido na técnica, utilizando um material de partida opticamente puro ou um reagente conhecido.

Os exemplos preferidos do composto heterocíclico de Fórmula 1 contendo grupo beta-amino, de acordo com a presente invenção, podem incluir os seguintes compostos:

- 1) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 2) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(metoximetil)piperazin-2-ona;
- 3) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(etoximetil)piperazin-2-ona;
- 4) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(isopropoximetil)piperazin-2-ona;
- 5) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(ciclopentiloximetil)piperazin-2-ona;
- 6) Dicloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (dietilamino)metil] piperazin-2-ona;
- 7) Dicloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (etilmethylamino)metil]piperazin-2-ona;

- 8) Dicloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(morfolinometil) piperazin-2-ona;
- 9) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butiltiometil)piperazin -2-ona;
- 10) Cloridrato de  $(S)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 11)  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-arnino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 12) Tartarato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 13) Citrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 14) Fosfato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 15) Acetato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 16) Malato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 17) Succinato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona; e
- 18) Adipato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona.

O composto heterocíclico de Fórmula 1 contendo o grupo beta-amino, de acordo com a presente invenção, inclui um seu sal farmaceuticamente aceitável, bem como um hidrato e solvato, que pode ser preparado a partir deste.

O sal farmaceuticamente aceitável do composto heterocíclico de Fórmula 1 pode ser preparado por qualquer método convencional para a preparação de sais conhecido na técnica.

Como aqui utilizada, a expressão "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal preparado a partir de uma base ou ácido não tóxico farmaceuticamente aceitável, incluindo uma base inorgânica ou orgânica e um ácido inorgânico ou orgânico. Os exemplos do sal farmaceuticamente aceitável podem incluir sais do Composto 1 com uma base inorgânica, e. g., ião alumínio, amónio, cálcio, cobre, férrico, ferroso, lítio, magnésio, manganato, manganês, potássio, sódio ou zinco. São particularmente preferidos os sais de amónio, cálcio, magnésio, potássio e sódio. Um sal sólido pode ter uma ou mais estruturas cristalinas ou, de outro modo, pode estar na forma de um hidrato. Os exemplos do sal orgânico não tóxico farmaceuticamente aceitável podem incluir sais do Composto 1 com uma amina primária, secundária ou terciária, uma amina substituída, tal como uma amina substituída de ocorrência natural, uma amina cíclica ou uma resina básica de permuta iônica, tais como arginina, betaina, cafeína, colina, N,N'-dibenziletlenodiamina, dietilamina, 2-dietolaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resina poliamina, procaína, purina, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, e trometamina.

Quando o composto da presente invenção é básico, pode ser preparado um seu sal a partir de ácidos não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis, incluindo ácidos inorgânicos e orgânicos. Os exemplos do ácido podem incluir ácido acético, ácido benzenossulfónico, ácido benzóico, ácido canforsulfónico, ácido cítrico, ácido etanossulfónico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glutâmico, ácido bromídrico, ácido clorídrico,

ácido isetiónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido mállico, ácido mandélico, ácido metanossulfónico, ácido múcico, ácido nítrico, ácido pamóico, ácido pantoténico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido p-toluenossulfónico e ácido adípico. São particularmente preferidos os ácidos acético, clorídrico, mállico, fosfórico, succínico, tartárico e adípico.

Quando o composto de Fórmula 1 é aqui designado, este termo destina-se a englobar um seu sal farmaceuticamente aceitável.

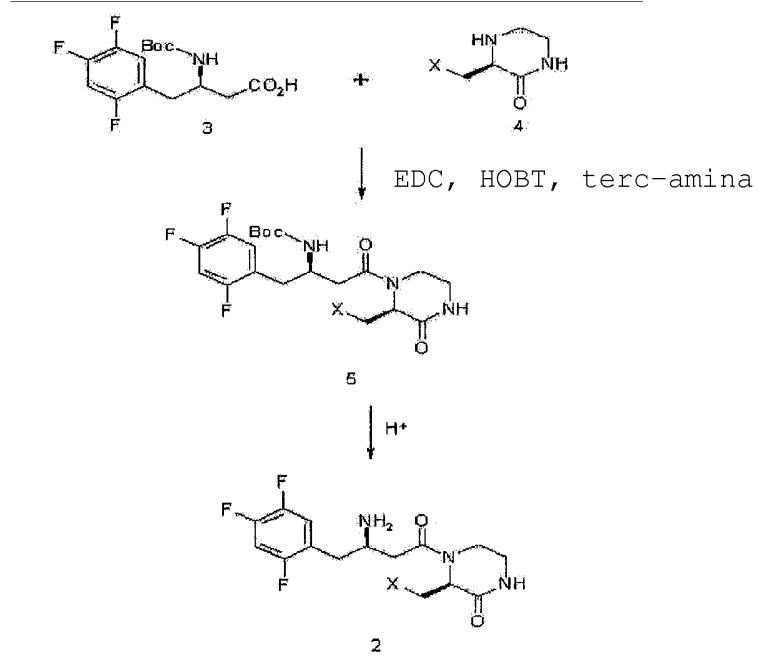
Como aqui utilizado, o termo "hidrato" significa um composto de Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, o qual inclui ainda uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de água ligada a este, por forças intermoleculares não covalentes. O hidrato pode conter mais do que 1 equivalente de água, tipicamente, 1 a 5 equivalentes de água. O hidrato pode ser preparado por cristalização do composto de Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em água ou solvente contendo água.

Como aqui utilizado, o termo "solvato" significa um composto de Fórmula 1 ou um seu sal, o qual inclui ainda uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de água ligada a este, por forças intermoleculares não covalentes. Os solventes preferidos são voláteis, não tóxicos e/ou aceitáveis para administração a humanos. Por exemplo, pode ser feita menção a etanol, metanol, propanol, cloreto de metíleno, etc.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um método para preparar um composto heterocíclico com um grupo beta-amino, representado pela Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção, como mostrado no Esquema 1 de Reacção abaixo, inclui um método para preparar um composto heterocíclico representado pela Fórmula 2, compreendendo 1) fazer reagir um composto de Fórmula 3 possuindo um grupo beta-amino com um composto heterocíclico substituído de Fórmula 4, na presença de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e amina terciária, para preparar, desse modo, um composto de Fórmula 5 possuindo uma ligação peptídica e 2) fazer reagir o composto de Fórmula 5 na presença de um ácido, para preparar um composto heterocíclico de Fórmula 2 possuindo um grupo beta-amino.

[Esquema 1 de Reação]



em que X é como definido na Fórmula 1.

Por exemplo, pode ser obtido um intermediário de Fórmula 5 por fazer reagir o composto de Fórmula 3 e o composto de Fórmula 4, de um modo convencional, num solvente, tais como N,N-dimetilformamida (DMF) ou diclorometano, na presença de um reagente de acoplamento, tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) ou 1-hidroxibenzotriazole (HOBT) e uma base, tais como diisopropiletilamina ou trietilamina, a 0 °C até à temperatura ambiente, durante 3 a 48 horas.

De modo a impedir a participação de um composto na peptização, um átomo de azoto do intermediário de Fórmula 5, o qual foi preparado por peptização, é protegido com um grupo protector. O composto heterocíclico de Fórmula 2 desejado, possuindo um grupo beta-amino, pode ser obtido por remoção do grupo protector, através de desprotecção. Isto é, uma vez que o grupo protector é Boc, a remoção do grupo protector pode ser realizada sob condições acídicas utilizando, tipicamente, ácido trifluoroacético/diclorometano, acetato de etilo/cloreto de hidrogénio, cloreto de hidrogénio/diclorometano ou metanol/cloreto de hidrogénio, a 0 °C até à temperatura ambiente, durante 1 a 24 horas.

Se necessário, o composto de Fórmula 2 preparado pela reacção da ligação peptídica e de desprotecção pode ser purificado a partir de subprodutos indesejáveis por qualquer método convencional, tais como recristalização, trituração, cromatografia preparativa em camada fina, cromatografia flash em sílica gel (ver W.C. Still *et al.*, J. Org. Chem., 43, 2923 (1978)) ou HPLC. O composto purificado por HPLC pode ser separado como o seu sal correspondente. O composto de Fórmula 5 também pode ser purificado do mesmo modo.

Na presente invenção, é preparada uma mistura estereoisomérica de um composto de Fórmula 1, utilizando uma mistura de estereoisómeros como um material de partida e a mistura resultante é separada em estereoisómeros individuais para, desse modo, obter um composto de Fórmula 1. Além disso, cada estereoisómero do composto de Fórmula 1 pode ser preparado utilizando cada estereoisómero como um material de partida. A separação do estereoisómero pode ser realizada por cromatografia em coluna convencional ou recristalização.

Na preparação do composto de Fórmula 2, o composto de Fórmula 3 utilizado no Esquema 1 de Reacção está comercializado ou pode ser facilmente preparado por qualquer método conhecido na técnica.

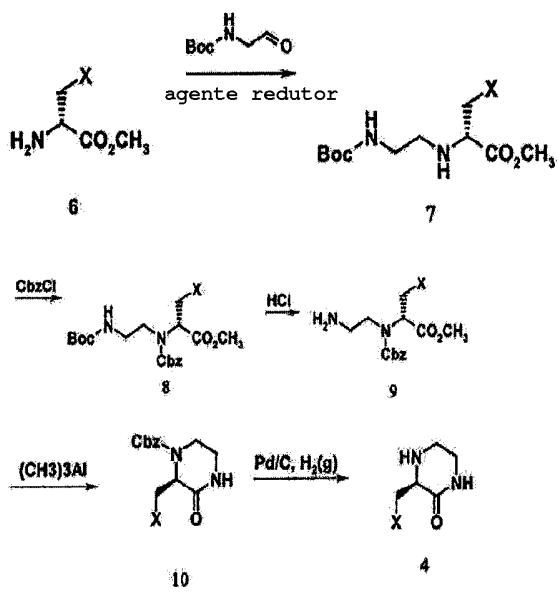
Na preparação do composto de Fórmula 2, o composto de Fórmula 4 utilizado no Esquema 1 de Reacção pode ser preparado de acordo com a via sintética do Esquema 2 de Reacção e Esquema 3 de Reacção.

No Esquema 2 de Reacção, o Composto 6 pode estar comercializado ou pode não estar comercializado, dependendo de um substituinte X, de modo que o Composto 6 está comercializado ou pode ser facilmente preparado por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, o método como representado no Esquema 3 de Reacção abaixo.

No Esquema 2 de Reacção, o Composto 4 utilizado para preparar o composto da presente invenção pode ser preparado a partir do Composto 6. Especificamente, o Composto 6 é feito reagir com N-butiloxicarbonil-2-aminoacetaldeído na

presença de um agente redutor para obter o Composto 7, a partir do qual o Composto 8, possuindo uma amina secundária protegida por benziloxicarbonilo (Cbz) é depois preparado, seguido por desprotecção para, desse modo, preparar o Composto 9, em que o butiloxicarbonilo (Boc) foi desprotegido. O Composto 9 é depois ciclizado, utilizando trimetilalumínio (ou diisopropiletilamina/etanol, hidrogenocarbonato de sódio/metanol, etc.) para obter o Composto 10, o que é seguido por desprotecção de Cbz para preparar o Composto 4. Os exemplos do agente redutor que pode ser utilizado na preparação do Composto 7 a partir do Composto 6 podem incluir cianoboro-hidreto de sódio, triacetoxiboro-hidreto de sódio, boro-hidreto sódio e semelhantes.

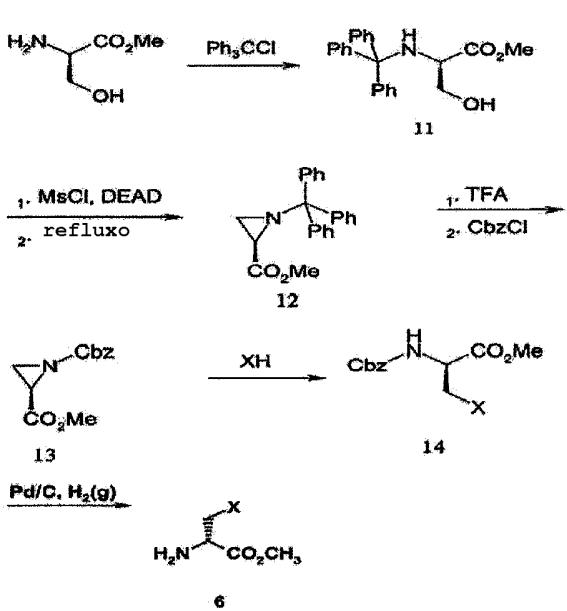
[Esquema 2 de Reação]



em que X é como definido na Fórmula 1.

Quando o Composto 6 no Esquema 2 de Reacção não está comercializado, este pode ser preparado analogamente ao Esquema 3 de Reacção abaixo. O Composto 6 possuindo vários substituintes R1 no Esquema 3 de Reacção é preparado pela substituição do éster metílico de D-serina com cloreto de tritilo, para obter o Composto 11 e substituindo um grupo hidroxilo do Composto 11 com um grupo mesilo, seguido por refluxo para, desse modo, preparar um composto 12 de aziridina. Depois, o grupo tritilo do Composto 12 é removido utilizando ácido trifluoroacético, seguido por protecção de benziloxicarbonilo (Cbz) para preparar o Composto 13. O Composto 13 é, depois, feito reagir com HX, possuindo vários substituintes R1, para preparar o Composto 14, seguido por desprotecção de Cbz para preparar o Composto 6.

[Esquema 3 de Reacção]



em que X é como definido na Fórmula 1.

De modo a facilitar a reacção de interesse ou evitar a formação do produto de reacção indesejado para alguns dos compostos de Fórmula 1 da presente invenção, as condições de reacção acima mencionadas e sequências de reacção podem variar como pretendido.

Como descrito acima, os compostos de Fórmula 1 da presente invenção, materiais de partida e intermediários podem ser sintetizados por vários métodos conhecidos na técnica.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica para a prevenção e tratamento de diabetes ou obesidade, compreendendo um composto de Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo.

O composto de Fórmula 1, de acordo com a presente invenção, apresenta excelente actividade inibitória na DPP-IV. Quando foi medida a capacidade inibitória do composto de Fórmula 1 na enzima DPP-IV,  $IC_{50}$ , a concentração de fármaco que é necessária para inibir a reacção enzimática de DPP-IV em 50%, apresenta praticamente uma gama de 0,5 a 20 nM, o que representa a actividade inibitória superior de DPP-IV, quando comparado com um inibidor de DPP-IV convencional, referido por ter um  $IC_{50}$  de diversas centenas de nM até diversos milhares de nM, ou mesmo até diversas dezenas de milhar de nM (Jinyou Xu, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 4759-4762; e Linda L. B., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 4763-4766).

Além disso, o composto de Fórmula 1, de acordo com a presente invenção, tem elevada tolerância oral de glucose. De

acordo com o teste de tolerância oral de glucose (OGTT), o composto de Fórmula 1 foi medido para ter os efeitos de diminuição de glucose no sangue superiores a 35%, de um modo preferido, mais do que 50%, representando, por este motivo, que este tem biodisponibilidade superior quando comparado com inibidores de DPP-IV convencionais. Além disso, os resultados experimentais *in vivo*, incluindo correlações farmacocinéticas/farmacodinâmicas, medição de um período de duração da actividade inibitória de DPP-IV e experiências cinéticas *in vivo*, demonstram que o composto da presente invenção é superior na actividade inibitória e biodisponibilidade de DPP-IV.

Por esse motivo, a composição farmacêutica compreendendo o composto de Fórmula 1 como um ingrediente activo pode ser utilizada de modo eficaz para o tratamento e prevenção de diabetes e obesidade, as quais são doenças representativas provocadas por DPP-IV.

A composição farmacêutica compreendendo o composto de Fórmula 1 ou um seu estereoisómero, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato ou solvato como um ingrediente activo pode ser formulada em várias das seguintes formas de dosagem orais ou parentéricas sem estar limitada a estas.

Os exemplos da forma de dosagem para administração oral podem incluir comprimidos, pílulas, cápsulas moles e duras, soluções, suspensões, emulsões, xaropes, grânulos, elixires e semelhantes. Estas formulações farmacêuticas podem compreender, além do ingrediente activo acima referido, um ou mais diluentes ou excipientes convencionais, tais como agentes de enchimento, extensores, agentes humectantes, desintegrantes,

agentes de deslizamento, aglutinantes e tensioactivos. Os exemplos dos desintegrantes podem incluir agar, amido, ácido algínico ou um seu sal de sódio, mono-hidrogenofosfato de cálcio anidro e semelhantes. Os exemplos dos agentes de deslizamento podem incluir sílica, talco, ácido esteárico ou um seu sal de magnésio ou cálcio, polietilenoglicol e semelhantes. Os exemplos dos aglutinantes podem incluir aluminossilicato de magnésio, pasta de amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulose pouca substituída e semelhantes. Além disso, a formulação farmacêutica pode compreender diluentes, e. g., lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina. Se desejado, a formulação pode compreender ainda, de um modo convencional, misturas efervescentes conhecidas, absorventes, corantes, aromas e adoçantes.

A composição farmacêutica compreendendo o composto de Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo pode ser administrada por meio de uma via parentérica, por exemplo, um supositório, injecção subcutânea, injecção intravenosa, injecção intramuscular ou injecção intratorácica. Para a formulação da composição da presente invenção numa preparação para administração parentérica, o composto de Fórmula 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável é misturado com um estabilizador ou tampão na presença de água para preparar uma solução ou suspensão, o qual é depois fabricado numa forma de dosagem unitária de ampolas ou frasquinhos.

A composição pode ser esterilizada e/ou compreender adjuvantes, tais como conservantes, estabilizadores, agentes de

hidratação, emulsionantes, sais para controlar a pressão osmótica e/ou tampões e substâncias terapeuticamente úteis, e pode ser formulada de acordo com métodos convencionais, tais como mistura, granulação e revestimento.

Se desejado, o composto de Fórmula 1 ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo como um ingrediente activo podem ser administrados em combinação com outros fármacos, por exemplo, fármacos antidiabéticos.

Quando o composto de Fórmula 1 ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo como um ingrediente activo é formulado numa forma de dosagem unitária, o composto de Fórmula 1 é aplicado, de um modo preferido, numa dose unitária de aprox. 0,1 a 1500 mg em termos de ingrediente activo. Como será evidente para os especialistas na técnica, a dose eficaz do composto activo, de acordo com a presente invenção, pode ser determinada de acordo com a prescrição do médico, dependendo de vários factores, tais como peso corporal e idade dos doentes, a natureza e gravidade da doença e semelhantes. Para os adultos, a dose eficaz do composto activo está, tipicamente, numa gama de cerca de 1 a 500 mg/dia, tendo em consideração a frequência e intensidade da administração. No caso de injecção intramuscular ou intravenosa a adultos, podem ser apropriados, por dia, cerca 5 a 300 mg da dose total, dividida em diversas doses unitárias, apesar de poder ser necessária uma dose mais elevada para alguns doentes.

## **EFEITOS VANTAJOSOS**

Como será aqui especificamente ilustrado a seguir, a presente invenção proporciona um composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino e possuindo excelentes efeitos inibitórios na actividade enzimática de DPP-IV. A composição farmacêutica compreendendo o mesmo composto da presente invenção como um ingrediente activo apresenta excelente actividade inibitória e biodisponibilidade de DPP-IV e pode, então, ser útil para a profilaxia ou tratamento de várias doenças consideradas como provocadas por DPP-IV, tais como diabetes e obesidade.

## **DESCRICAÇÃO DOS DESENHOS**

A Fig. 1 mostra correlações entre a actividade de DPP-IV no plasma e dose de fármaco, obtidas para MK-0431 e um composto do Exemplo 1; e

A Fig. 2 mostra resultados da medição e comparação da duração da actividade inibitória de DPP-IV obtida para MK-0431 e um composto do Exemplo 1 em ratos de laboratório.

## **MODO PARA A INVENÇÃO**

A presente invenção será agora descrita em maior detalhe, fazendo referência aos seguintes Exemplos.

**Exemplo 1: Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

**Passo 1: Preparação de 1-tritilaziridina-2-carboxilato de (R)-metilo**

Adicionaram-se 200 g de éster metílico de D-serina a 1,8 L de clorofórmio e a solução de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou, lentamente, 448 mL de trietilamina. Adicionaram-se, lentamente, 358,4 g de cloreto de tritilo à mistura de reacção a qual foi, depois, agitada durante 1 hora. A mistura de reacção foi aquecida até à temperatura ambiente e adicionou-se a esta 1 L de clorofórmio, seguido por lavagem com 2,5 L de água. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou, depois, sequencial e lentamente, 484 mL de trietilamina e 15,7 g de 4-metilaminopiridina. A mistura de reacção foi agitada durante 5 min e adicionou-se a esta, lentamente, 139 mL de cloreto de metanossulfônico. A mistura de reacção foi aquecida até à temperatura ambiente, agitada durante mais 4 horas e, depois, submetida a refluxo durante 12 horas. A mistura de reacção foi arrefecida até à temperatura ambiente e lavada com 4 L de água e, depois, 3 L de solução salina. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e concentrada até à secura sob pressão reduzida. Adicionaram-se 3 L de etanol ao resíduo resultante, o qual foi depois agitado. Os sólidos resultantes foram filtrados para dar 329 g do composto em epígrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,42 a 7,49 (m, 6H), 7,18 a 7,32 (m, 9H), 7,68 (s, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,24 (m, 1H), 1,87 (m, 1H) e 1,40 (m, 1H)

**Passo 2: Preparação de aziridina-1,2-dicarboxilato de  
(R)-1-benzil-2-metilo**

Dissolveram-se 328,4 g de 1-tritiaziridina-2-carboxilato de (R)-metilo em 1,4 L de clorofórmio e a solução de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou, depois, 462 mL de ácido trifluoroacético. Agitou-se a mistura de reacção durante 1 hora, à qual se adicionou, depois, 2 L de água, seguido por agitação durante 10 min e remoção da camada orgânica. A camada aquosa foi neutralizada com hidrogenocarbonato de sódio e utilizada em reacções subsequentes sem purificação adicional.

Adicionaram-se 2 L de éter dietílico e 120,5 g de hidrogenocarbonato de sódio à camada aquosa e a solução de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou, depois, lentamente, gota a gota, 165 mL de cloroformato de benzilo. Agitou-se a mistura de reacção durante mais 2 horas e a camada aquosa foi descartada. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, concentrada e seca sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna para dar, desse modo, 108,5 g do composto em epígrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO): 7,32-7,36 (m, 5H), 5,13 (s, 2H), 3,09 (dd,  $J=3,2, 5,4$  Hz, 1H), 2,58 (dd,  $J=1,2, 3,2$  Hz, 1H) e 2,47 (dd,  $J=1,2, 5,4$  Hz, 1H)

**Passo 3: Preparação de éster metílico de (R)-2-amino-3-t-butoxipropano**

Dissolveram-se 1,1 g de aziridina-1,2-dicarboxilato de (R)1-benzil-2-metilo em 11 mL de clorofórmio, ao qual se adicionou, depois, 18 mL de t-butanol. Adicionou-se à mistura de reacção, lentamente, gota a gota, 1,2 mL de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ , seguido por agitação durante 12 horas. A reacção foi terminada com a adição de 2 L de água à mistura de reacção. Depois, a camada orgânica foi separada e seca sobre sulfato de magnésio, concentrada e seca sob pressão reduzida e, depois, utilizada em reacções subsequentes sem purificação adicional.

O resíduo resultante foi dissolvido em 10 mL de metanol, ao qual se adicionou, depois, 740 mg de paládio/carbono em 2 mL de acetato de etilo, seguido por borbulhamento de hidrogénio, durante 1 hora, sob pressão atmosférica ambiente. A mistura de reacção foi filtrada e seca sob pressão reduzida, para dar 736 mg do composto em epigrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 4,21 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,74-3,88 (m, 2H) e 1,20 (s, 9H)

**Passo 4): Preparação do éster metílico do ácido (R)-3-terc-butoxi-2-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etilamino)propiónico**

Dissolveram-se 736 mg de éster metílico de (R)-2-amino-3-t-butoxipropano preparados no Passo 3 em 14 mL de diclorometano, ao qual se adicionou, depois, lentamente, 6335 mg de N-t-butoxicarbonil-2-aminoacetaldeído metanol. A mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C, seguido por adição gradual de

1,2 mL de trietilamina e 1,78 g de sódio triacetoxiboro-hidreto. A mistura de reacção foi aquecida até à temperatura ambiente, seguida por agitação durante 12 horas. Adicionou-se uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio para terminar a reacção e a camada orgânica foi lavada com 10 mL de água e solução salina, concentrada e seca sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna para dar, desse modo, 355 mg do composto em epigrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,10 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 1H), 3,15–3,28 (m, 2H), 2,81 (m, 1H), 2,67 (m, 1H), 1,42 (s, 9H) e 1,13 (s, 9H)

**Passo 5): Preparação do éster metílico do ácido  
(R)-2-((benziloxicarbonil)(2-t-butoxicarbonilamino)etil)amino)-  
3-terc-butoxipropiónico**

Dissolveram-se 355 mg do éster metílico do ácido (R)-3-terc-butoxi-2-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etilamino)propiónico preparado no Passo 4 em 11 mL de tetra-hidrofuranô e a mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou, depois, 187 mg de hidrogenocarbonato de sódio. Adicionou-se a esta, lentamente, gota a gota, 192  $\mu\text{L}$  de benzilcloroformato e a mistura de reacção foi aquecida até à temperatura ambiente. Após 12 horas, a mistura de reacção foi seca sob pressão reduzida, seguido por adição de 10 mL de acetato de etilo e a camada orgânica foi lavada com 10 mL de água. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, seca sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna para dar, desse modo, 410 mg do composto em epigrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,36-7,25 (m, 5H), 5,82-5,72 (m, 1H), 5,17-5,03 (m, 2H), 4,15 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,60 (m, 1H), 3,42-3,28 (m, 3H), 1,40 (s, 9H) e 1,14 (s, 9H)

**Passo 6): Preparação de 2-(terc-butoximetil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato de (R)-benzilo**

Dissolveram-se 410 mg do éster metílico do ácido (R)-2-((benziloxicarbonil)(2-t-butoxicarbonilamino)etil)amino)-3-terc-butoxipropiónico preparado no Passo 5 em 10 mL de metanol e a mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou depois, lentamente, 4 mL de ácido clorídrico/éter dietílico 2 N, seguido por agitação, durante 3 horas. A mistura de reacção foi seca sob pressão reduzida e utilizada em reacções subsequentes, sem purificação adicional.

Dissolveu-se o resíduo resultante em 10 mL de diclorometano e a mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C, à qual se adicionou depois, lentamente, 152  $\mu\text{L}$  de trietilamina. Adicionou-se a esta, lentamente, 1,1 mL de trimetilalumínio (solução 2,0 M em tolueno) e a mistura de reacção foi aquecida até à temperatura ambiente e, depois, agitada durante 12 horas. A mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C e adicionou-se uma solução aquosa saturada de cloreto de amónio para terminar a reacção. Adicionaram-se 10 mL de acetato de etilo à mistura de reacção, a qual foi, depois, lavada com 10 mL de solução salina. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e seca sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna para dar 103 mg do composto em epígrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,34-7,25 (m, 5H), 6,27 (m, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,57 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,29 (m, 1H) e 1,09 (s, 9H)

**Passo 7): Preparação de (R)-(3-terc-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 103 mg de 2-(terc-butoximetil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato de (R)-benzilo preparado no Passo 6 em 2 mL de metanol, ao qual se adicionou, depois, 50 mg de paládio/carbono em 1 mL de acetato de etilo, seguido por borbulhamento de hidrogénio, durante 1 hora, sob pressão atmosférica ambiente. A mistura de reacção foi filtrada e seca sob pressão reduzida, para dar 58 mg do composto em epígrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6,41 (brs, 1H), 3,76 (m, 3H), 3,63 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,45 (brs, 1H) e 1,17 (s, 9H)

**Passo 8): Preparação de (R)-4-[ (R)-2-(terc-butoximetil)-3-oxopiperazin-1-il]-4-oxo-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-ilcarbamato terc-butílico**

Dissolveram-se 104 mg de ácido (3R)-t-butoxicarbonilamino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanóico e adicionaram-se 58 mg de (R)-(3-terc-butoximetil)piperazin-2-ona a 4 mL de N,N-dimetilformamida, à qual se adicionou, depois, 63 mg de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT) e 217  $\mu\text{L}$  de diisopropiletilamina. A mistura de reacção foi arrefecida para 0 °C e adicionaram-se a

esta 78 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), seguido por agitação à temperatura ambiente, durante 12 horas. A mistura de reacção foi diluída com 10 mL de acetato de etilo e lavada duas vezes com solução salina. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e concentrada. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna para dar 97 mg do composto em epígrafe.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,03 (m, 1H), 6,88 (m, 1H), 5,97 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 4,16-4,07 (m, 1H), 4,02-3,91 (m, 1H), 3,74 (m, 2H) 3,37 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 2,92 (m, 2H), 2,80 (m, 1 H), 2,59 (m, 2H), 1,34 (d, 9H) e 1,13 (s, 9H)

**Passo 9): Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(terc-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 97 mg de (R)-4-[ (R)-2-(terc-butoximetil)-3-oxopiperazin-1-il]-4-oxo-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-ilcarbamato terc-butílico preparado no Passo 8 em 3 mL de metanol, seguido por adição de 2 mL de ácido clorídrico/éter dietílico 2 N e agitação à temperatura ambiente, durante 3 horas. A mistura de reacção foi concentrada e seca sob pressão reduzida para dar 64 mg do composto em epígrafe como um sólido espumoso.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,37 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,59-4,40 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,90-3,83 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,38 (m, 2H), 3,27 (m, 1H), 3,07 (m, 2H), 2,89-2,66 (m, 2H), 1,18 (s, 3H) e 1,11 (s, 6H)

Massa (M+1) : 402

**Exemplo 2: Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(metoximetil)piperazin-2-ona**

Utilizou-se metanol em vez de t-butanol no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 40 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 do Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,34 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,62-4,46 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,87-3,82 (m, 2H), 3,66 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 3,04 (m, 2H), 2,94-2,72 (m, 2H) e 3,27 (s, 3H)

Massa (M+1) : 360

**Exemplo 3: Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(etoximetil)piperazin-2-ona**

Utilizou-se metanol em vez de t-butanol no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 66 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 do Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,38 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 4,83 (m, 1H), 4,54-4,44 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,93-3,82 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,53 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,26 (m, 1H), 3,07 (m, 2H), 2,90-2,70 (m, 2H) e 1,11 (t, 3H)

Massa (M+1) : 374

**Exemplo 4: Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(isopropoximetil)piperazin-2-ona**

Utilizou-se isopropanol em vez de t-butanol no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 69 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,38 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,62-4,43 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 3,90-3,87 (m, 2H), 3,77 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,44 (m, 2H), 3,26 (m, 1H), 3,08 (m, 2H), 2,95-2,69 (m, 2H) e 1,15 (m, 6H)

Massa (M+1): 388

**Exemplo 5: Preparação de cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(ciclopentiloximetil)piperazin-2-ona**

Utilizou-se ciclopentanol em vez de t-butanol no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 51 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,38 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,61-4,42 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,90-3,82 (m, 2H), 3,67 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,08 (m, 2H), 3,01-2,62 (m, 2H) e 1,67-1,50 (m, 8H)

Massa (M+1): 414

**Exemplo 6: Preparação de dicloridrato (R)-4-1(R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[(dietilamino)metil]piperazin-2-ona**

Adicionou-se dietilamina em vez de t-butanol e realizou-se refluxo em vez de adição de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 68 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,41 (m, 1H), 7,24 (m, 1H), 5,21 (m, 1H), 3,59-3,53 (m, 2H), 3,50-3,53 (m, 4H), 3,43-3,37 (m, 4H), 3,35 (m, 2H), 3,09 (m, 2H), 2,97-2,81 (m, 2H) e 1,37 (m, 6H)

Massa (M+1): 401

**Exemplo 7: Preparação de dicloridrato de (R)-4-[(R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[(etilmethylamino)metil]piperazin-2-ona**

Adicionou-se etilmethylamina em vez de t-butanol e realizou-se refluxo em vez de adição de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 67 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,42 (m, 1H), 7,24 (m, 1H), 5,22 (m, 1H), 4,08-3,87 (m, 2H), 3,86-3,75 (m, 2H), 3,68-3,57 (m, 2H), 3,56-3,33 (m, 4H), 3,09 (m, 2H), 3,02-2,81 (m, 5H) e 1,38 (m, 3H)

Massa (M+1) : 387

Exemplo 8: Preparação de dicloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(morfolinometil)piperazin-2-ona

Adicionou-se morfolina em vez de t-butanol e realizou-se refluxo em vez de adição de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 27 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,37 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 4,12-3,98 (m, 4H), 3,97-3,77 (m, 4H), 3,74-3,52 (m, 4H), 3,48-3,39 (m, 2H), 3,14-2,91 (m, 4H) e 2,86-2,72 (m, 2H)

Massa (M+1) : 415

Exemplo 9: Preparação de dicloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butiltiometil)piperazin-2-ona

Utilizou-se t-butiltiol em vez de t-butanol no Passo 3 do Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 25 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 4 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,34 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 5,04 (m, 1H), 4,60 (s, 1H), 4,60-4,41 (m, 1H), 3,86 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,05 (m, 2H), 2,95 (m, 1H), 2,81 (m, 2H) e 1,26 (s, 9H)

Massa (M+1) : 418

**Exemplo 10: Preparação de cloridrato (S)-4-((R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Utilizou-se cloridrato do éster metílico de L-serina em vez de cloridrato do éster metílico D-serina no Passo 1 de Exemplo 1 e sintetizaram-se, depois, 31 mg do composto em epígrafe, analogamente aos Passos 2 até 9 de Exemplo 1.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,34 (m, 1H), 7,24 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,580-4,40 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 3,86-3,74 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,19 (m, 1H), 3,05-2,86 (m, 3H), 2,67 (m, 1H), 1,15 (s, 4H) e 1,03 (s, 5H)

Massa (M+1) : 402

**Exemplo 11: Preparação de (R)-4-[(R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Adicionaram-se 60 mg do composto obtido no Exemplo 1 a 10 mL de uma solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio a 5% e a mistura foi extraída duas vezes com 10 mL de uma solução mista de diclorometano/2-propanol (4/1 (v/v)). A camada orgânica foi seca sob pressão reduzida para dar 55 mg do composto em epígrafe, como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,27 (m, 1H), 7,14 (m, 1H), 4,56-4,39 (m, 1H), 3,96-3,81 (m, 3H), 3,70 (m, 1H), 3,46 (m,

1H), 3,43-3,32 (m, 1H), 2,83-2,65 (m, 3H), 2,58-2,40 (m, 2H), 1,16 (s, 3H) e 1,11 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 12: Preparação de tartarato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 55 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 0,56 mL de acetona, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 26 mg de ácido L-tartárico em 0,35 mL de etanol/água (9/1 (v/v)), seguido por agitação, durante 30 min. A esta adicionaram-se 0,56 mL de 2-propanol, seguido por agitação durante 10 min e filtração para dar 77 mg do composto em epígrafe, como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,38 (m, 1H), 7,22 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,59-4,40 (m, 1H), 4,40 (s, 2H), 3,93 (m, 1H), 3,90-3,83 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,38 (m, 2H), 3,27 (m, 1H), 3,07 (m, 2H), 2,89-2,66 (m, 2H), 1,15 (s, 3H) e 1,11 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 13: Preparação de citrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 496 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 2 mL de etanol, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 273 mg de ácido cítrico anidro num 1 mL de água,

seguido por agitação, durante 30 min. A mistura de reacção foi concentrada, à qual de adicionou, depois, lentamente, 2 mL de acetato de etilo e 1 mL de 2-propanol, por agitação. A esta adicionaram-se 15 mL de hexano, seguido por agitação durante 10 min e filtração, para dar 637 mg do composto em epígrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,34 (m, 1H), 7,22 (m, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,58-4,40 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,87 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,03 (m, 2H), 2,94-2,70 (m, 4H), 1,18 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 14: Preparação de fosfato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 501 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 3 mL de 2-propanol, ao qual de adicionou, depois, lentamente, 84  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ácido fosfórico a 85%, seguido por agitação, durante 30 min. A esta adicionaram-se 3 mL de 2-propanol e a mistura resultante foi agitada durante 10 min e filtrada, para dar 100 mg do composto em epígrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7,33 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,58-4,41 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,37 (m, 2H), 3,22 (m, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,69 (m, 2H), 1,17 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 15: Preparação de acetato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 500 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 3 mL de acetato de etilo, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 74,5 mg de ácido acético num 1 mL de acetato de etilo, seguido por agitação, durante 30 min. A mistura de reacção foi concentrada, à qual de adicionou, depois, 2 mL de acetato de etilo e 1 mL de 2-propanol, seguido por agitação. A esta adicionaram-se 15 mL de hexano e a mistura resultante foi agitada durante 10 min e filtrada, para dar 495 mg do composto em epígrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,32 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,87 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,34 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 2,90 (m, 2H), 2,76-2,58 (m, 2H), 1,94 (s, 3H), 1,17 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 16: Preparação de malato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 498 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 4 mL de acetona, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 166 mg de ácido L-málico em 1 mL de acetona, seguido por agitação, durante 30 min. A mistura de reacção foi concentrada, à qual de adicionou, depois, 2 mL de acetato de etilo e 1 mL de 2-propanol, seguido por agitação. A esta

adicionaram-se 15 mL de hexano e a mistura resultante foi agitada durante 10 min e filtrada, para dar 506 mg do composto em epígrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,34 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,58-4,39 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,84 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,22 (m, 1H), 3,02 (m, 2H), 2,82-2,63 (m, 3H), 2,50 (m, 1 H), 1,17 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 17: Preparação de succinato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 498 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 3 mL de acetona, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 147 mg de ácido succínico em 2 mL de acetona/água (20/1 (v/v)), seguido por agitação, durante 30 min. A mistura de reacção foi concentrada até à secura, sob pressão reduzida, para dar 596 mg do composto em epígrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,34 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,58-4,40 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 2,92 (m, 2H), 2,81-2,64 (m, 2H), 2,51 (s, 4H), 1,18 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 18: Preparação de adipato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-tritluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona**

Dissolveram-se 503 mg do composto obtido no Exemplo 11 em 4 mL de acetato de etilo, ao qual de adicionou, depois, lentamente, uma solução de 183 mg de ácido adípico em 3 mL de acetona/água (30/1 (v/v)), seguido por agitação, durante 30 min. A mistura de reacção foi concentrada, à qual de adicionou, depois, lentamente, 2 mL de acetato de etilo e 1 mL de 2-propanol, seguido por agitação. A esta adicionaram-se 15 mL de hexano e a mistura resultante foi agitada durante 10 min e filtrada, para dar 336 mg do composto em epigrafe como um sólido.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,32 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,56-4,40 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,87 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 2,92 (m, 2H), 2,83-2,58 (m, 2H), 2,25 (m, 4H), 1,63 (m, 4H), 1,21 (s, 3H) e 1,12 (s, 6H)

Massa (M+1): 402

**Exemplo 1 Experimental: Ensaio da actividade inibitória de DPP-IV**

De modo a examinar a capacidade inibitória de DPP-IV dos Compostos de Fórmula 1 da Invenção preparados nos Exemplos 1 até 18, foram realizados as seguintes experiências.

A DPP-IV, conhecida como protease de serina, foi adquirida de R & D Sistemas. A MK-0431 foi preparada como controlo, de acordo com o método como divulgado em J. Med. Chem., 2005, 48,

141-151. De modo a avaliar a eficácia de fármaco dos Compostos de Fórmula 1 da Invenção, foi medida a actividade de ligação de inibidores sintéticos de DPP-IV, utilizando o substrato fluorogénico Gly-Pro-AMC. A reacção enzimática foi realizada a 25 °C, numa solução tampão contendo Tris/HCl a 25 mM (pH 8,0), utilizando 50 µM de Gly-Pro-AMC relativamente a 100 ng/mL de DPP-IV, com concentrações variadas do inibidor. O IC<sub>50</sub>, o qual é uma constante de inibição do inibidor, foi dado pela medição da fluorescência com um espectrofluorímetro após a reacção enzimática durante 1 hora e, depois, cálculo de uma concentração do inibidor que é necessária para inibir a reacção enzimática de DPP-IV em 50%. O espectrofluorímetro foi um espectrofotómetro Tecan SpectraFluor com um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 465 nm. Como resultado, o IC<sub>50</sub>, medido como a capacidade do composto de Fórmula 1 inibir a actividade de DPP-IV, foi na gama de 0,5 a 20 nM (Tabela 1: actividade inibitória de DPP-IV humana *in vitro*). A partir deste resultado, pode ser observado que o Composto de Fórmula 1 da Invenção possui excelente actividade inibitória de DPP-IV, quando comparado ao valor de IC<sub>50</sub> referido para o JANUVIA comercializado ou compostos inibidores convencionais de DPP-IV (variando desde diversas centenas de nM a diversos milhares de nM).

[Tabela 1]

Exemplo Nº	IC <sub>50</sub> (nM)
MK-0431	28,3
Exemplo 1	0,72
Exemplo 2	7,4
Exemplo 3	2,2
Exemplo 4	4,3
Exemplo 5	1,7
Exemplo 6	11,0
Exemplo 7	17,4
Exemplo 8	5,2
Exemplo 9	1,3
Exemplo 10	48,7
Exemplo 11	0,8
Exemplo 12	1,05
Exemplo 13	0,81
Exemplo 14	0,92
Exemplo 15	0,87
Exemplo 16	0,73
Exemplo 17	1,2
Exemplo 18	0,71

**Exemplo 2 Experimental: Teste da tolerância oral à glucose (OGTT)**

De modo a investigar os efeitos antidiabéticos de uma composição farmacêutica compreendendo o Composto de Fórmula 1 da Invenção como um ingrediente activo, foi realizado um teste de tolerância oral à glucose (OGTT), o qual mede a

capacidade do corpo de metabolizar a glucose num dado período de tempo.

Para este objectivo, os animais de laboratório (murganhos C57BL/6) foram colocados em jejum durante 16 a 17 horas antes das experiências. O sangue foi recolhido das veias caudais dos animais na manhã do dia da experiência e foi medido um nível de glucose no sangue, com um Medidor de Glucose no Sangue Accu-Chek Active (Roche Diagnostics). A composição farmacêutica com um veículo foi administrada oralmente, 30 min antes da administração de glucose (-30 min), seguida por administração oral de uma solução de glucose (2 g/kg/10 mL), após 30 min (0 min). A recolha de sangue foi realizada em intervalos de tempo designados - mesmo antes da administração de fármaco, mesmo antes da administração de glucose e 5, 15, 30, 60 e 90 min após a administração de glucose.

Em resultado, os Exemplos 1, 3 e 12 apresentaram efeitos superiores de diminuição de glucose no sangue de 54%, 52% e 62%, respectivamente, numa dose de 1 mg/kg, quando comparados com o grupo de controlo (sem administração de uma composição com um veículo). A partir destes resultados, pode ser observado que o Composto de Fórmula 1 da Invenção pode ser útil para o tratamento de doenças relacionadas com a DPP-IV, incluindo diabetes e obesidade, devido à elevada biodisponibilidade.

**Exemplo 3 Experimental: Correlação farmacocinética/farmacodinâmica de inibidor de DPP-IV (actividade de DPP-IV no plasma vs. dose de fármaco)**

De modo a verificar os efeitos antidiabéticos do Composto de Fórmula 1 da Invenção, foi realizada a avaliação comparativa na actividade inibitória de DPP-IV no plasma, entre os Compostos da Invenção e MK-0431. Murganhos C57BL6 com 8 semanas de idade foram administrados, oralmente, com MK-0431 e Composto da Invenção (composto do Exemplo 1) em doses individuais, seguido por administração de glucose, numa dose de 2 g/kg, após 1 hora. Após 10 min, o sangue foi recolhido dos olhos dos animais. O plasma sanguíneo foi obtido a partir do sangue recolhido e foram medidas a actividade de DPP-IV no plasma e a concentração de fármaco no plasma.

A actividade de DPP-IV no plasma foi dada pela medição de uma quantidade de AMC fluorescente (7-Amino-4-metilcoumarina) libertada pela acção de DPP-IV após utilização de Gly-Pro-AMC (Bachem, Suíça) como um substrato. Para este objectivo, foram adicionados 50 µL de plasma a uma solução de reacção (100 mM de HEPES, pH 7,6, 0,1 mg/mL, 50 µM de Gly-Pro-AMC) e foi calculada uma taxa de libertação de AMC, a 25 °C, durante 5 min.

Como resultado, o composto de Fórmula 1 (Exemplo 1) apresentou actividade inibitória 4 a 5 vezes mais elevada numa concentração plasmática de 10 ng/mL, em conjunto com EC<sub>50</sub> (concentração eficaz de 50%) e EC<sub>80</sub> (concentração eficaz de 80%) 8 a 9 vezes superior, quando comparado com MK-0431 (ver Fig. 1).

**Exemplo 4 Experimental: Ensaio de DPP-IV in vivo (duração da actividade inibitória de DPP-IV)**

De modo a investigar os efeitos antidiabéticos do Composto de Fórmula 1 da Invenção, a actividade inibitória DPP-IV no plasma e uma sua duração foram avaliadas, comparativamente, entre MK-0431 e o Composto da Invenção (Exemplo 1), após administração de compostos de fármaco em ratos SD normais.

Para este objectivo, os animais de laboratório (ratos SD) foram colocados em jejum durante 16 a 17 horas, antes das experiências. No dia da experiência, os animais em jejum foram anestesiados com éter, seguido por canulação aórtica abdominal. Posteriormente, o MK-0431 e o Composto da Invenção (Exemplo 1) foram diluídos para 0,5% de MC e administrados aos animais. Antes da administração de fármaco (0 h) e após períodos de tempo designados após a administração de fármaco, o sangue foi recolhido em tubos de heparina de 500 µL previamente preparados e o plasma foi separado. Foram adicionados 50 µL de plasma a cada solução de reacção (0,1 M de HEPES, pH 7,6, 0,1 mg/mL, 50 µM de Gly-Pro-AMC) e foi realizado um estudo cinético durante 5 min, para calcular uma taxa de reacção.

Como resultado, verificou-se que o Composto da Invenção, numa dose de 10 mg/kg, retinha 90% ou mais da actividade inibitória de DPP-IV até 24 horas após a administração, a qual é uma actividade significativamente mais elevada, considerando o facto de que o MK-0431 reteve apenas cerca de 50% da

actividade inibitória DPP-IV após o mesmo período de 24 horas (ver Fig. 2).

#### **Exemplo 5 Experimental: Experiências cinéticas *in vivo***

De modo a medir uma semi-vida *in vivo* do Composto de Fórmula 1 da Invenção, ratos SD normais (8 semana de idade) foram administrados oralmente com MK-0431 e Composto da Invenção (Exemplos 1, 3 e 12), numa dose de 10 mg/kg. O sangue foi amostrado periodicamente a partir da aorta femoral e foi medido o tempo de retenção *in vivo* do composto original. Como resultado, o Composto da Invenção apresentou semi-vida *in vivo* superior (T<sub>1/2</sub>) à da MK-0431.

[Tabela 1]

	Exemplo 1	Exemplo 3	Exemplo 12	MK-0431
T <sub>1/2</sub> (hora)	7,9	7,6	5,5	4,8

#### **APLICABILIDADE INDUSTRIAL**

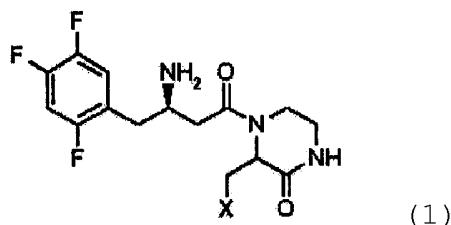
Como é evidente a partir da descrição acima, a presente invenção permite a produção de um composto heterocíclico contendo um grupo beta-amino, o qual tem excelentes efeitos inibitórios na actividade de DPP-IV. Além disso, uma composição farmacêutica compreendendo o mesmo composto da presente invenção como um ingrediente activo apresenta excelente actividade inibitória e biodisponibilidade de DPP-IV e pode ser, então, útil para a profilaxia ou tratamento de várias doenças

consideradas como provocadas pela DPP-IV, tais como diabetes e obesidade.

Lisboa, 25 de Novembro de 2014

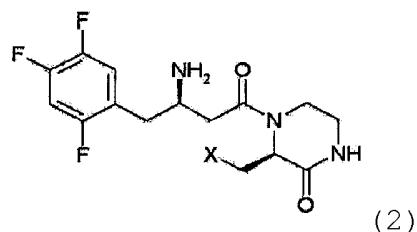
## REIVINDICAÇÕES

1. Composto representado pela Fórmula 1:



em que X é OR<sub>1</sub>, SR<sub>1</sub> ou NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub> e R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> de NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> podem formar um anel de 5 a 7 membros com inclusão de um heteroátomo O; ou um seu estereoisómero, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato ou solvato.

2. Composto da reivindicação 1, em que o composto está representado pela Fórmula 2:



em que X é como definido na reivindicação 1; ou um seu estereoisómero, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato ou solvato.

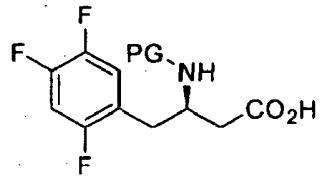
3. Composto da reivindicação 1, em que o composto é seleccionado do grupo consistindo de:

- 1) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(metoximetil)piperazin-2-ona;
- 2) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(etoximetil)piperazin-2-ona;
- 3) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(isopropoximetil)piperazin-2-ona;
- 4) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 5) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(ciclopentiloximetil) piperazin-2-ona;
- 6) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (dietilamino)metil]piperazin-2-ona;
- 7) Dicloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (etilmethylamino)metil]piperazin-2-ona;
- 8) Dicloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(morfolinometil)piperazina-2-ona;
- 9) Cloridrato de  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butiltiometil)piperazin-2-ona;
- 10) Cloridrato de  $(S)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 11)  $(R)$ -4-[ $(R)$ -3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;

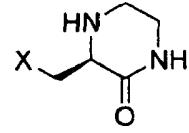
- 12) Tartarato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;
- 13) Citrato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;
- 14) Fosfato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;
- 15) Acetato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;
- 16) Malato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;
- 17) Succinato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ ;  
e
- 18) Adipato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{ piperazin-2-ona}$ .

4. Método para preparar um composto representado pela Fórmula 2 da reivindicação 2, compreendendo:

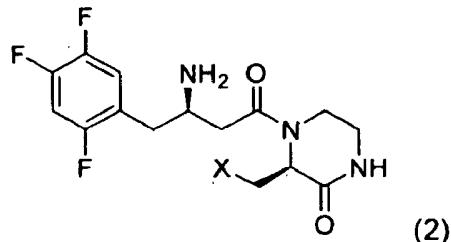
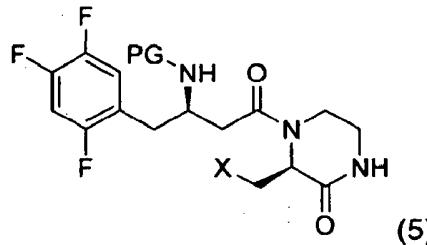
- 1) fazer reagir um composto de Fórmula 3 possuindo um grupo beta-amino com um composto heterocíclico substituído de Fórmula 4, na presença de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e amina terciária para, desse modo, preparar um composto de Fórmula 5, e
- 2) tratar o composto de Fórmula 5 obtido a partir do passo (1) com um ácido, para preparar um composto de Fórmula 2:



(3)



(4)



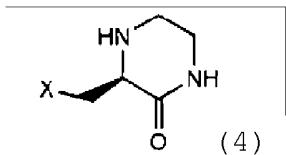
em que X é OR<sub>1</sub>, SR<sub>1</sub> ou NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub> e R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> de NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> podem formar um anel de 5 a 7 membros, com inclusão de um heteroátomo O.

5. Composição farmacêutica para a prevenção e tratamento de diabetes ou obesidade, compreendendo um composto da reivindicação 1 representado pela Fórmula 1 ou um seu estereoisómero, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato ou solvato como um ingrediente activo.
6. Composição da reivindicação 5, em que o composto é seleccionado do grupo consistindo de:
  - 1) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;

- 2) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(etoximetil)piperazin-2-ona;
- 3) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(isopropoximetil)piperazin-2-ona;
- 4) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(metoximetil)piperazin-2-ona;
- 5) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(ciclopentiloximetil) piperazin-2-ona;
- 6) Dicloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (diethylamino)metil]piperazin-2-ona;
- 7) Dicloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-[ (ethylmethylamino)metil] piperazin-2-ona;
- 8) Dicloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(morpholinometil)piperazin-2-ona;
- 9) Cloridrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butyltiometil)piperazin-2-ona;
- 10) Cloridrato de (S)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 11) (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 12) Tartarato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 13) Citrato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;
- 14) Fosfato de (R)-4-[ (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(t-butoximetil)piperazin-2-ona;

- 15) Acetato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{piperazin-2-ona}$ ;  
 16) Malato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{piperazin-2-ona}$ ;  
 17) Succinato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{piperazin-2-ona}$ ;  
 e  
 18) Adipato de  $(R)-4-[ (R)-3\text{-amino}-4-(2,4,5\text{-trifluorofenil})\text{butanoil}]-3\text{-}(t\text{-butoximetil})\text{piperazin-2-ona}$ .

7. Composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para utilização num método de tratamento ou prevenção de diabetes ou obesidade num mamífero.
8. Utilização de uma composição farmacêutica compreendendo o composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para a preparação de um medicamento para a prevenção e tratamento de diabetes ou obesidade.
9. Método da reivindicação 4, em que o PG é Boc.
10. Composto representado pela Fórmula 4, utilizado para preparar um composto de Fórmula 2 da reivindicação 2:

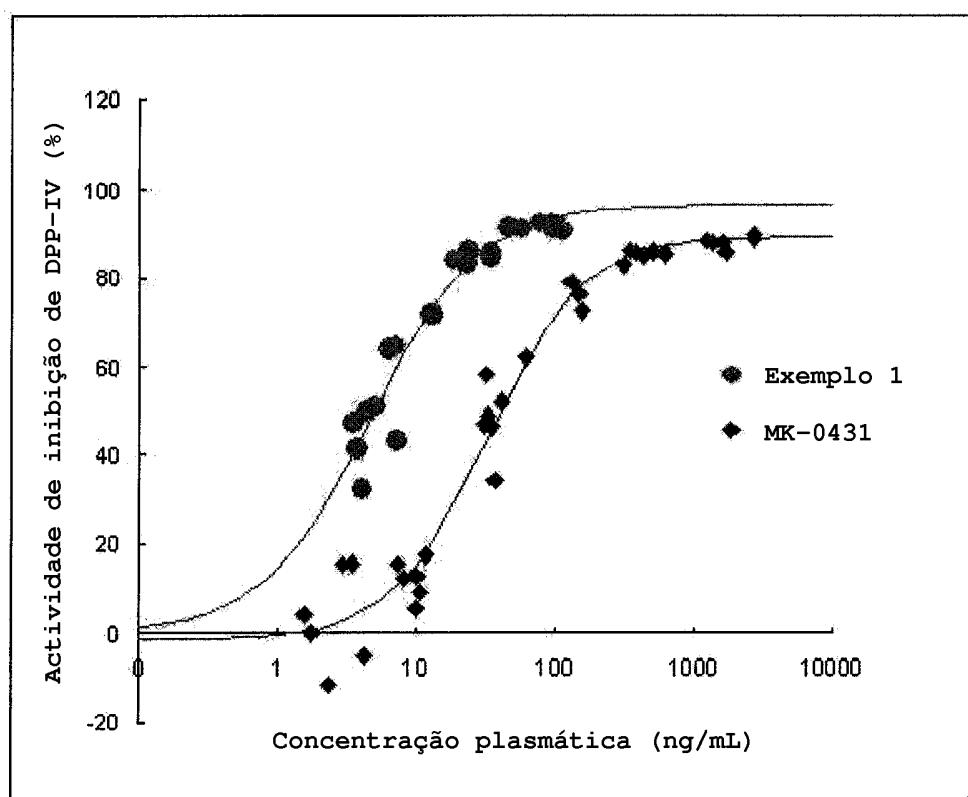


em que X é  $\text{OR}_1$ ,  $\text{SR}_1$  ou  $\text{NR}_1\text{R}_2$ , em que  $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  são, independentemente, alquilo  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_5$  e  $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  de  $\text{NR}_1\text{R}_2$  podem

formar um anel de 5 a 7 membros com inclusão de um heteroátomo O.

11. Composto da reivindicação 10, em que o X é seleccionado do grupo consistindo de terc-butoxilo, metoxilo, etoxilo, isopropoxilo, ciclopentiloxilo, dietilamino, etilmethylamino, morfolino e terc-butiltio.
12. Composto da reivindicação 10, em que o X é terc-butoxilo.

Lisboa, 25 de Novembro de 2014

**Fig. 1**

**Fig. 2**