

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 802**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

C07D 213/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2019 PCT/US2019/048788**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2020 WO20051058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2019 E 19769621 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3846809**

54 Título: **Compuestos de 2,6-diamino piridina**

30 Prioridad:

04.09.2018 US 201862726520 P

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

07.06.2024

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)

Lilly Corporate Center

Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

DURHAM, TIMOTHY BARRETT

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 971 802 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de 2,6-diamino piridina

La presente invención se refiere a compuestos inhibidores novedosos de la cetohecoquinasa (KHK), a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y al uso de los compuestos para el tratamiento de ciertas afecciones, tal como la diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), la insuficiencia cardíaca, la enfermedad renal diabética y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

El síndrome metabólico se define comúnmente como una agrupación de afecciones que reflejan una sobrealimentación y un estilo de vida sedentario, y sus manifestaciones incluyen la DMT2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA), la obesidad, la dislipidemia, la insuficiencia cardíaca y la enfermedad renal.

La DMT2 se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina causada por una disfunción de las células β pancreáticas y una resistencia a la insulina en los órganos diana. Esta representa más del 90 % de los pacientes con diabetes y da lugar a complicaciones microvasculares y macrovasculares que causan un profundo malestar psicológico y físico a los pacientes, al tiempo que suponen una enorme carga para los sistemas de atención sanitaria (Davies, M.J., et al.; *Lancet*, 389, 2239-2251, 2017).

La insuficiencia cardíaca es un síndrome causado por anomalías cardíacas estructurales o funcionales que conducen a presiones intracardíacas elevadas o a un gasto cardíaco reducido en reposo o durante el esfuerzo. La insuficiencia cardíaca es una causa principal y creciente de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Teerlink, J.R., et al.; *Lancet*, 390, 1981-1995, 2017).

La enfermedad renal diabética se desarrolla en casi la mitad de los pacientes con DMT2 y es la principal causa de enfermedad renal crónica en todo el mundo. Los cambios metabólicos asociados a la diabetes provocan hiperfiltración glomerular, albuminuria progresiva, disminución de la tasa de filtración glomerular y, en última instancia, enfermedad renal terminal (Alicic, R.Z., et al.; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 2032-2045, 2017).

El HGNA representa un espectro de enfermedad hepática que puede conducir a EHNA progresiva, fibrosis y, en última instancia, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática. Se calcula que, en los próximos 20 años, el HGNA se convertirá en la principal causa de morbilidad y mortalidad hepática, así como en la principal indicación de trasplante de hígado (Bertot, L.C., et al.; *Int. J. Mol. Sci.*, 17(5), 774, 2016).

La KHK, también denominada fructoquinasa, es la enzima limitante de la tasa involucrada en el metabolismo de la fructosa. Cataliza la fosforilación de la fructosa a fructosa-1-fosfato (F1P), provocando el agotamiento concomitante de los niveles de ATP celular. A diferencia de la glucosa, el metabolismo de la fructosa carece de inhibición por retroalimentación y desencadena la acumulación de intermediarios que intervienen, por ejemplo, en la lipogénesis, la gluconeogénesis y la fosforilación oxidativa (Hannou, S.A., et al.; *J. Clin. Invest.*, 128(2), 544-555, 2018). Esto tiene consecuencias metabólicas negativas que se asocian a una serie de trastornos metabólicos graves.

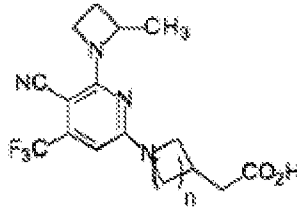
La KHK existe en dos isoformas empalmadas alternativamente que consisten en la KHK-C y la KHK-A que difieren en el exón 3. La KHK-C se expresa principalmente en el hígado, el riñón y el intestino, mientras que la KHK-A es más ubicua. Los ratones deficientes en ambas isoformas están totalmente protegidos del síndrome metabólico inducido por la fructosa. Sin embargo, los efectos metabólicos adversos se exacerban en ratones que carecen únicamente de KHK-A (Ishimoto T, et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 109(11), 4320-4325, 2012).

Diversos estudios epidemiológicos y experimentales han informado que el aumento del consumo de fructosa, y más específicamente el aumento del metabolismo de la fructosa, puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de ciertos trastornos, incluido el síndrome metabólico y, en particular, en el desarrollo de la DMT2 (Softic et al.; *J. Clin. Invest.*, 127(11), 4059-4074, 2017), insuficiencia cardíaca (Mirtschink, P., et al.; *Eur. Heart J.*, 39, 2497-2505, 2018), enfermedad renal diabética (Cirillo, P., et al.; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20, 545-553, 2009) y NAFLD/NASH (Vos, M.B., et al.; *Hepatology*, 57, 2525-2531, 2013). Se espera que la inhibición de la KHK limite el metabolismo de la fructosa y ofrezca opciones terapéuticas eficaces para diversos trastornos metabólicos.

US 2017/0183328 A1 divulga 3-azabicyclo[3.1.0]hexanos sustituidos como inhibidores de KHK. Huard et al.; *J. Med. Chem.* 2017, 60, 7835-7849, informan del descubrimiento de un inhibidor selectivo de KHK con potencia y propiedades adecuadas para evaluar la inhibición de KHK en modelos de rata. Maryanoff et al.; *ACS Med. Chem. Lett.* 2011, 2, 538-543 describen el descubrimiento de inhibidores de KHK de pirimidinopirimidina con una sustitución específica que complementa el sitio de unión a ATP.

Existe la necesidad de tratamientos alternativos para el síndrome metabólico y las indicaciones asociadas que incluyen la DMT2, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad renal diabética y la EHNA. En particular, se requieren compuestos con actividad inhibitoria de KHK para proporcionar opciones de tratamiento para estas enfermedades. Además, se requieren inhibidores potentes de la KHK que tengan propiedades importantes para el uso terapéutico en seres humanos, tal como la biodisponibilidad oral y una semivida suficiente para soportar una dosis diaria, o un perfil limitado de interacciones farmacológicas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I:

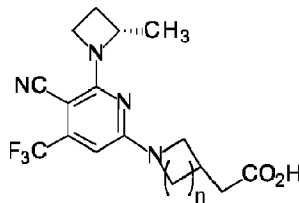


Fórmula I

en la que n es 1 o 2; o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

- 5 La Fórmula I incluye todos los enantiómeros y diastereómeros individuales de la misma, así como las mezclas de enantiómeros y racematos.

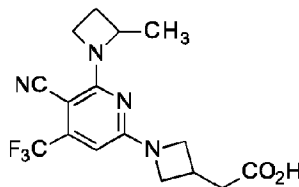
En una realización particular, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



10

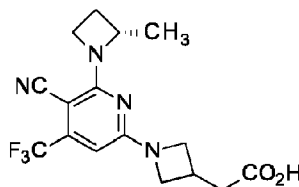
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, n es 1. En esta realización, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



15

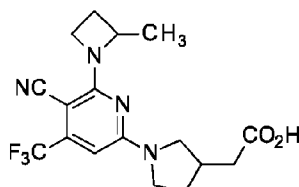
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferente, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



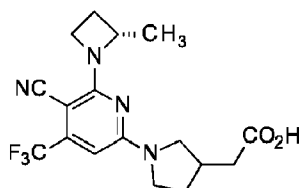
20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

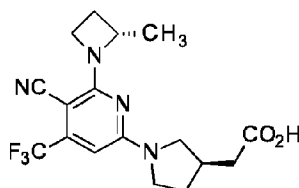
En otra realización, n es 2. En esta realización, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferente, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferente adicional, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En esta realización, el compuesto de la invención es el ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acético o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, en una realización, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia. En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de DM2. En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética. En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento de NASH. En una realización particular, la presente invención también proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética. En una realización, la invención también proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico, EHGNA, obesidad, complicaciones diabéticas por ejemplo retinopatía diabética, enfermedad cardiovascular, enfermedad arterial coronaria, o dislipidemia. En una realización preferente, el compuesto de la Fórmula I en los usos terapéuticos anteriores es el ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, la invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la invención, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes aceptables para uso farmacéutico. En una realización, la invención proporciona además un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes aceptables para uso farmacéutico.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar" incluyen frenar, retrasar, detener o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero. Preferiblemente, el paciente es humano.

5 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o la dosis del compuesto de la invención, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo que, tras la administración de una sola dosis o de dosis múltiples al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente que está siendo diagnosticado o tratado.

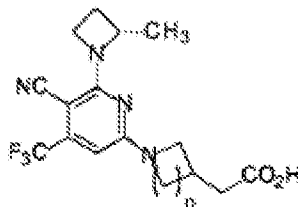
10 Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad una cantidad efectiva mediante el uso de técnicas conocidas y por medio de la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. A la hora de determinar la cantidad efectiva para un paciente, se tienen en cuenta una serie de factores, entre los que se incluyen: la especie del paciente; su tamaño, edad y estado de salud general; la enfermedad o el trastorno específico de que se trate; el grado de afectación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto concreto administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias pertinentes.

15 Los compuestos de la presente invención son eficaces a una dosis diaria comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal.

20 Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible. Preferentemente, tales composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y los procesos para prepararlas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, L.V. Allen, editor, 22da edición, Pharmaceutical Press, 2012).

25 Los compuestos de la Fórmula I y las sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos son particularmente útiles en los usos terapéuticos de la invención, siendo preferentes ciertas configuraciones. La siguiente lista de compuestos de la presente invención describe tales configuraciones. Se comprenderá que estas preferencias son aplicables a los compuestos de la invención, así como a los usos terapéuticos y composiciones farmacéuticas.

Los compuestos de la presente invención incluyen:

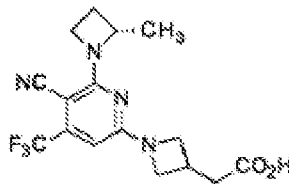


Fórmula Ia

30

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos adicionales de la presente invención incluyen:

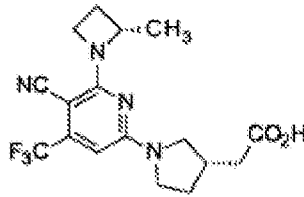


Fórmula IIa

35

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos adicionales de la presente invención incluyen:



Fórmula IIIa'

y sus sales aceptables para uso farmacéutico.

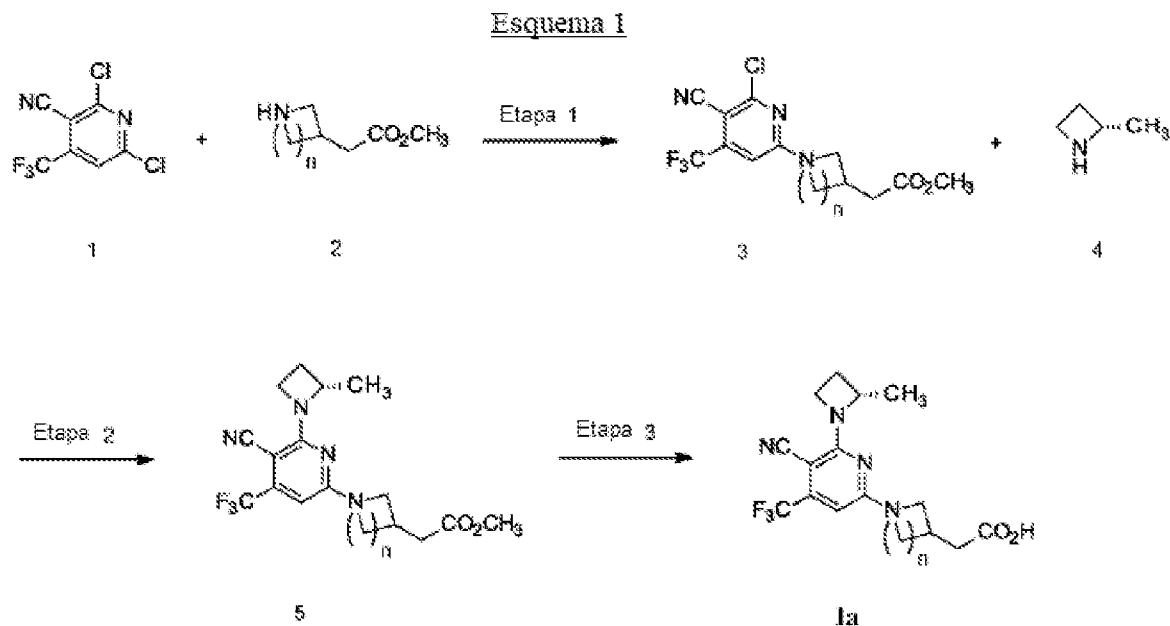
- 5 Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diasterómeros individuales, así como mezclas de los mismos, incluyendo racematos, son particularmente preferentes los compuestos de la Fórmula Ia, Fórmula IIa y IIIa", y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los isómeros y enantiómeros individuales pueden ser separados o resueltos por los expertos en la técnica en cualquier punto conveniente de la síntesis de los compuestos de la invención, por medio de procedimientos tales como las técnicas de cristalización selectiva o la cromatografía quiral (véase, por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981 y E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994), o cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (Véase, por ejemplo, T. A. Berger, "Supercritical Fluid Chromatography Primer", Agilent Technologies, julio de 2015).

15 Se puede formar una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención, por ejemplo, mediante la reacción de una forma neutra apropiada de un compuesto de la invención y un ácido farmacéuticamente aceptable apropiado o base en un disolvente adecuado en condiciones estándar bien conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Bastin, R.J., *et al.*; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 y Berge, S.M., *et al.*; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977).

20 Los compuestos de la presente invención, o las sales de los mismos, se pueden preparar por medio de una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, las preparaciones y los ejemplos siguientes. Los productos de cada etapa del siguiente esquema se pueden recuperar por procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. En los esquemas que se presentan a continuación, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son los definidos anteriormente. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Sin limitar el alcance de la invención, los siguientes esquemas, preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención. Además, los expertos en la técnica aprecian que los compuestos de la Fórmula Ia se pueden preparar mediante el uso de un material de partida con la correspondiente configuración estereoquímica, que pueden preparar los expertos en la técnica.

30 Otras abreviaturas se definen como sigue: "ABT" se refiere a 1-aminobenzotriazol, "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "CAS#" se refiere a número de Chemical Abstracts Registry, "DCM" se refiere a cloruro de metileno o diclorometano; "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DMEM" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "ELSD" se refiere a detector de dispersión de luz por evaporación; "ES/MS" se refiere a Espectrometría de Masas por Electropulverización"; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol o alcohol etílico; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "h" se refiere a hora u horas; 35 "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "Me" se refiere a metilo; "MeOH" se refiere a metanol; "MTBE" se refiere a metil-terc-butíléter; "min" se refiere a minuto o minutos; "m/z" se refiere a relación masa-carga; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fofato; "Ph" se refiere a fenilo; "RBF": matraz de fondo redondo; "SCX" se refiere a intercambio selectivo de cationes; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; "TA" se refiere a temperatura ambiente; THF" se refiere a tetrahidrofurano.



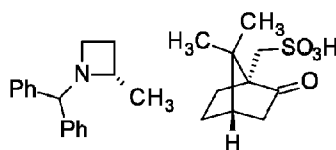
El Esquema 1 representa la preparación general de los compuestos de Fórmula I. En la Ttapa 1, 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (1) y una amina cíclica (2) se hacen reaccionar en presencia de una base, tal como NaHCO₃ o DIPEA, en EtOH o MeOH para producir una aminopiridina (3). Alternativamente, el disolvente de reacción para esta etapa puede ser DCM. En la Etapa 2, el compuesto 3 se hace reaccionar con 2-metil azetidina (4) a temperatura elevada y en presencia de una base, como NaHCO₃ o DIPEA, en EtOH o MeOH para dar una diaminopiridina (5). Alternativamente, el disolvente de reacción para esta etapa puede ser THF. En la Etapa 3, el resto de éster se hidroliza utilizando una base como NaOH o LiOH en MeOH o THF a temperatura elevada para dar un compuesto de Fórmula Ia. Alternativamente, esta etapa puede realizarse utilizando los mismos reactivos en un reactor de microondas.

Preparaciones y Ejemplos

Las siguientes Preparaciones y Ejemplos ilustran de forma adicional la invención y representan la síntesis típica de los compuestos de la presente invención. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles o pueden ser fácilmente sintetizados por los expertos en la técnica. Se debe comprender que las Preparaciones y los Ejemplos se exponen a modo de ilustración y no de limitación, y que los expertos en la técnica pueden llevar a cabo diversas modificaciones.

La LC-ES/MS se lleva a cabo en un sistema de cromatografía líquida AGILENT® HP1100. Las mediciones de espectrometría de masas por electropulverización (adquiridas en modo positivo y/o negativo) se llevan a cabo en un espectrómetro de masas cuadrupolar con detector selectivo de masas interconectado al ELSD HP1100. Condiciones LC-MS (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0 × 50 mm 3,0 μm; gradiente: de 5 a 95% B en 1,5 min, posteriormente 95% B durante 0,5 min temperatura de la columna: 50 °C +/-10 °C; caudal: 1,2 ml/min; Disolvente A: agua desionizada con 0,1% de HCOOH; Disolvente B: ACN con 0,1% de ácido fórmico; longitud de onda 216 nm. Si el HPLC está equipado con un ELSD, los ajustes son 45 °C de temperatura del evaporador, 40 °C de temperatura del nebulizador y 1,6 de caudal de gas SLM. Condiciones alternativas de LC-MS (pH alto): columna: Columnas WATERS™ XTERRA® MS C18 de 2,1 × 50 mm, 3,5 μm; gradiente: de 5 a 95% B en 1,5 min, posteriormente 95% B durante 0,50 min temperatura de la columna: 50 °C +/-10 °C; caudal: 1.2 ml/min; volumen de inyección 1μL; disolvente A: 10 mM NH₄HCO₃ pH 9; Disolvente B: ACN; longitud de onda: 200-400 nm y 212-216nm; si tenía ELSD: 45°C de temperatura del evaporador, 40°C de temperatura del nebulizador y 1,60 de caudal de gas SLM.

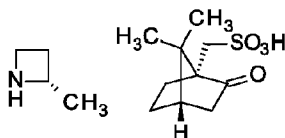
Preparación 1 sal de ácido (2S)-1-Benzhidril-2-metil-azetidina [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfónico



Montar un RBF de 3 cuellos de 2000 ml con un embudo de adición, una entrada de nitrógeno y un adaptador de termómetro. Purgar el recipiente con nitrógeno y añadir (3R)-butano-1,3-diol (25 g, 277,4 mmol), DIPEA (127 ml, 731

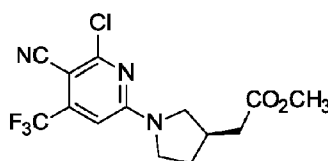
mmol) y ACN (556 ml). Enfriar la mezcla a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (101 ml, 601 mmol) gota a gota durante 3 h de forma que la temperatura interna se mantenga entre -35 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez completada la adición, agitar durante 10 min a -35 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (1,9 ml, 11 mmol) gota a gota durante 5 min de forma que la temperatura interna se mantenga entre -35 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez completada la adición, agitar durante 10 min a -35 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Añadir DIPEA (127 ml, 731 mmol) gota a gota durante 15 min de forma que la temperatura interna se mantenga entre -35 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez completada la adición, agitar durante 10 min a -35 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. En un matraz separado bajo nitrógeno, disolver aminodifenilmetano (48,0 ml, 270 mmol) en ACN (49 ml) y transferir la disolución resultante al embudo de adición. Añadir la solución de amina al triflato frío gota a gota durante 40 min de forma que la temperatura interna se mantenga entre -20 y $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez completada la adición, agitar durante 30 min a -35 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasar la reacción a un baño de agua y dejar que se caliente lentamente durante 30 min. Retirar el baño y dejar que la reacción se caliente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Trasladar el recipiente a un manto calefactor y calentar la reacción a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, después enfriar a RT. Verter la mezcla resultante en 1200 ml de agua y extraer con tolueno (400 ml \times 3). Combinar los extractos, lavar con agua, solución de NaCl sat. ac. secar sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrar y concentrar en un evaporador giratorio. Secar el material al vacío durante toda la noche. Disolver el residuo en DCM (400 ml). Preparar una almohadilla de gel de sílice en un embudo fritado y equilibrar con 1:1 heptano/EtOAc. Cargar la solución de producto en la almohadilla de gel de sílice y lavar con 1600 ml de heptano/EtOAc 1:1. Concentrar el filtrado para obtener un aceite rojo. Disolver el aceite en MeOH (250 ml) y colocar el matraz en un baño maría ($\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Añadir ácido L(-)-canforsulfónico (61,6 g, 265 mmol) por porciones manteniendo la temperatura interna por debajo de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Agitar la mezcla resultante durante 15 minutos y concentrar en un evaporador giratorio para obtener una espuma marrón. Secar la espuma en una bomba de vacío durante 2 h. Disolver la espuma en 130 ml de DCM. Colocar un embudo de adición en el matraz. Utilizar el embudo para añadir lentamente 1100 ml de EtOAc a la disolución en agitación. Transferir la mezcla resultante a un vaso de precipitados de 4000 ml y agitar abierta a la atmósfera durante toda la noche. Enfriar el vaso de precipitados en un baño de hielo durante 10 min. Recoger el precipitado en un embudo fritado por filtración al vacío lavando con una cantidad mínima de EtOAc helado. Secar el sólido sobre la frita durante 2 h. Disolver el sólido blanco resultante en una cantidad mínima de DCM, transferir a un vaso de precipitados de 2000 ml y diluir lentamente con EtOAc hasta que la solución clara empiece a enturbiarse. Agitar la suspensión durante 4 h mientras está abierta a la atmósfera. Se recogen los sólidos por filtración al vacío utilizando un embudo fritado y se secan sobre la frita durante la noche para dar el compuesto del título (111,8 g, 238,06 mmol, 86% de rendimiento) como sólido blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): 10.54-10.47 (m, 1H), 7.61 (d, $J=7.3$ Hz, 5H), 7.47-7.37 (m, 7H), 5.85 (d, $J=10.3$ Hz, 1H), 4.68-4.61 (m, 1H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.37 (s, 8H), 2.99 (d, $J=14.6$ Hz, 1H), 2.77-2.68 (m, 1H), 2.51-2.44 (m, 4H), 2.30-2.16 (m, 2H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.42-1.28 (m, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.77 (s, 4H); $>98\%$ ee [HPLC: Chiralcel OJ (10 cm \times 4,6 mm, 5 μm), 5 ml/min, EtOH 10% isocrático $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,2%PrNH₂)/CO₂].

Preparación 2 sal de (2S)-2-metilazetidín-1-ío de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-íl]metanosulfonato



En un recipiente Parr de 2250 ml se añade 20 % en peso de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ sobre carbono (6,62 g). Purgar la botella con nitrógeno y añadir 250 ml de MeOH. A la suspensión resultante, añadir lentamente sal de ácido (2S)-1-benzhidril-2-metil-azetidina [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-íl]metanosulfónico (111 g, 236 mmol) disuelta en 250 ml de MeOH. Sella el recipiente. Purgar con nitrógeno seguido de hidrógeno y presurizar a 60 PSI. Agitar enérgicamente el recipiente de reacción en un aparato Parr Shaker durante 15 h a temperatura ambiente. Purgar el recipiente con nitrógeno y después filtrar la mezcla de reacción a través de una almohadilla de celite, por lavado con MeOH. Concentrar el filtrado para obtener un sólido blanco y secar al vacío. Suspender el sólido en 780 ml de 1:1 MTBE/EtOAc y calentar la mezcla a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 h, después enfriar a TA y agitar durante toda la noche. Recoger los sólidos por filtración. Suspender los sólidos en 380 ml de MTBE y agitar a TA durante 24 h. Recoger el sólido blanco por filtración para dar el compuesto del título (41,5 g, 136,78 mmol, 58% de rendimiento). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): 8.68-8.55 (m, 1H), 4.51-4.42 (m, 1H), 3.91-3.75 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.91 (d, $J=14.6$ Hz, 1H), 2.69-2.61 (m, 1H), 2.52-2.46 (m, 2H), 2.28-2.22 (m, 1H), 2.17-2.10 (m, 1H), 1.96 (t, $J=4.5$ Hz, 1H), 1.89-1.79 (m, 1H), 1.43 (d, $J=6.7$ Hz, 2H), 1.36-1.26 (m, 1H), 1.05 (s, 2H), 0.75 (s, 2H).

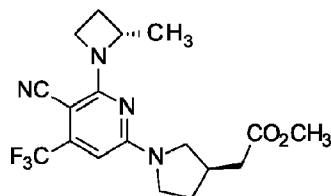
Preparación 3 2-[(3R)-1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidin-3-íl]acetato de metilo



Añadir a un RBF 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (123 mmol, 29,6 g) y EtOH (230 ml). Enfriar la mezcla a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Añadir NaHCO_3 (368 mmol, 31 g) seguido de una solución de clorhidrato de (R)-pirrolidin-3-acetato de metilo (23

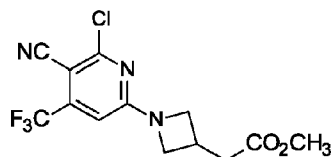
g, 123 mmol) en EtOH (230 ml). Dejar que la mezcla resultante se caliente a temperatura ambiente durante la noche. Evaporar la mezcla de reacción hasta sequedad en un evaporador giratorio. Añadir agua (200 ml) y extraer con MTBE (2 × 200 ml). Mezclar los extractos y evaporar hasta sequedad. Purificar por cromatografía en gel de sílice utilizando hexano/MTBE (gradiente de 20 a 70 %) para dar el compuesto del título (34,7 g, 99,89 mmol, rendimiento 81 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 348,0, 350,0 [M+H]⁺.

Preparación 4 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acetato de metilo



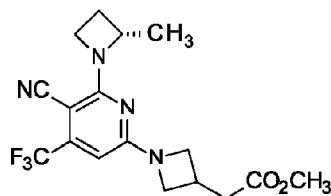
Añadir a un RBF 2-[(3R)-1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acetato de metilo (25,5 g, 73,3 mmol), sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidín-1-ío (88,0 mmol, 26,7 g), MeOH (255 ml) y NaHCO₃ (220 mmol, 18,5 g). Agitar la mezcla a 65°C durante 16 h. Añadir sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidín-1-ío (22,0 mmol, 6,68 g) y NaHCO₃ (147 mmol, 12,3 g) y continuar agitando durante 32 h. Eliminar el disolvente en un evaporador giratorio. Añadir al residuo agua (300 ml) y extraer con MTBE (2 × 200 ml). Combinar los extractos y secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar a través de gel de sílice y concentrar hasta sequedad para dar el compuesto del título (28,0 g, 73,2 mmol, 99% de rendimiento) como sólido blanco. ES/MS (m/z): 383,2 [M+H]⁺.

Preparación 5 2-[1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acetato de metilo

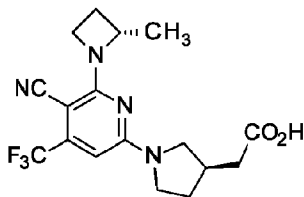


A una solución de 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (500 mg, 2,03 mmol) en EtOH (15 ml) añadir NaHCO₃ (0,549 g, 6,51 mmol) y sal de ácido trifluoroacético 2-(azetidín-3-il)acetato de metilo (0,494 g, 2,03 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h. Diluir la mezcla de reacción con solución acuosa saturada de NaCl (30 ml). Extraer con EtOAc (20 ml x 3). Combinar los extractos y lavar con solución acuosa saturada de NaCl (30 ml), secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar hasta sequedad. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc en éter de petróleo (gradiente 0-30%) para dar el compuesto del título (470 mg, 1,41 mmol, 66% de rendimiento) como sólido blanco. ES/MS (m/z) = 333,9 [M+H]⁺.

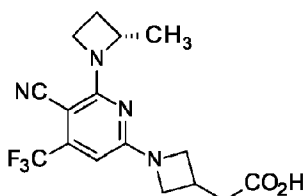
Preparación 6 2-[1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acetato de metilo



A una solución de 2-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acetato de metilo (200 mg, 0,569 mmol) en EtOH (6 ml) añadir NaHCO₃ (0,173 g, 2,05 mmol) y sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidín-1-ío (0,194 g, 0,626 mmol). Calentar la mezcla a 80 °C durante 16 h. Diluir con agua (50 ml) y extraer con EtOAc (40 ml x 3). Combinar los extractos y lavar con solución acuosa saturada de NaCl (50 ml), secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar a sequedad. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (0%-10%, EtOAc en éter de petróleo) para dar el compuesto del título (176 mg, 0,46 mmol, 77% de rendimiento) como sólido blanco. ES/MS (m/z): 383,1 [M+H]⁺.

Ejemplo 1 ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acético

5 Añadir a un RBF 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acetato de metilo (26,5 g, 69,3 mmol), MeOH (265 ml), y solución acuosa de NaOH 2M (416 mmol, 208 ml). Agitar la mezcla a 60°C durante 3 h. Enfriar a TA y eliminar el MeOH en un evaporador giratorio. Acidificar la fase acuosa a pH 3-4 utilizando solución acuosa concentrada de HCl. Extraer con EtOAc (400 ml). Lavar la capa orgánica con agua (200 ml), secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar a sequedad para dar el compuesto del título (22,5 g, 61,11 mmol, 88% de rendimiento) como una espuma blanca. ES/MS (m/z): 369.2 [M+H]⁺.

10 Ejemplo 2 ácido 2-[1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acético

15 A una mezcla de 2-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acetato de metilo (176 mg, 0,478 mmol) en THF (5,00 ml) y agua (1,00 ml) añadir LiOH (0,04 g, 0,955 mmol). Agitar la mezcla resultante a TA durante 2 h. Diluir con EtOAc (4 ml) y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 ml × 3). Combinar los extractos orgánicos y lavar con solución acuosa saturada de NaCl (3 ml × 2), secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar para obtener el compuesto del título (128 mg, 0,36 mmol, 78% de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z) 354,9 [M+H]⁺.

Ensayos**Ensayo de la actividad enzimática de la KHK para la KHK-C humana y la KHK-A humana**

20 La potencia intrínseca de los compuestos puede medirse utilizando un ensayo enzimático que mida la producción de F1P. Los compuestos se preparan en DMSO y se prueban en una curva de concentración de 10 puntos, para crear diluciones seriadas triplicadas de los compuestos en una placa de 96 pocillos que van de 20 μM a 1,02 nM. La enzima se prepara en tampón de ensayo [50 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES), 10 mM de cloruro potásico, 100 mM de cloruro magnésico, 2 mM de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 0,01% de n-octilglucósido]

25 y se incuba con los compuestos a RT durante 15 min. La reacción se lleva a cabo en volúmenes de 100 μL que contienen concentraciones de sustrato de fructosa (250 μM para el ensayo KHK-C y 1,25 mM para el ensayo KHK-A) y ATP (150 μM para ambas isoformas); que se incuban además a RT durante 20 min. A continuación, se interrumpe la reacción añadiendo un tampón de parada compuesto por ácido fórmico al 0,2% y 1 μg/ml de estándar interno ¹³C₆-fructosa-6-fosfato (¹³C₆-F6P). Las placas se almacenan a -20°C hasta el análisis RapidFire MS. Análisis RapidFire MS

30 para la cuantificación de F1P:

Un sistema de extracción automatizado Agilent 300 RapidFire (Agilent, Santa Clara, CA) con tres bombas cuaternarias de HPLC se acopla a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6495 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con una fuente de interfaz de ionización por electropulverización (ESI). Cargar un sistema RapidFire Mass Spec con un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) RapidFire HILIC (H1) reutilizable (G9205A).

35 El disolvente A, utilizado para la carga y el lavado de la muestra, es octilamina 6 mM (Acros Organics 129495000) llevada a pH 5.0 utilizando ácido acético. El disolvente B, utilizado para la elución de la muestra, es un 20% de agua en ACN que contiene un 0,1% de ácido fórmico. Las muestras se analizan secuencialmente por medio de la aspiración de 10 μl en el bucle de recolección al vacío directamente desde las placas multipocillo. Cargar 10 μL de muestra en el cartucho HILIC y lavar, por medio de la bomba cuaternaria 1, con el disolvente A a un caudal de 1,25 ml/minuto durante

40 5000 ms. Los analitos retenidos eluyen hacia el espectrómetro de masas por medio de la bomba cuaternaria 3, mediante el uso del disolvente B a un caudal de 1,25 ml/minuto durante 5000 ms. El sistema se reequilibra por medio de la bomba cuaternaria 1, mediante el uso del disolvente A a un caudal de 1,25 ml/min durante 2000 ms.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo está equipado con una fuente de ESI y los analitos se supervisan mediante el uso de la monitorización de reacción seleccionada (SRM) en modo negativo [M-H]⁻. El F1P se monitoriza

a m/z 259,02/96,9 y el $^{13}\text{C}_6$ -fructosa-6-fosfato se monitoriza a m/z 264,99/97. Los valores de la relación de área para la F1P se calculan utilizando $^{13}\text{C}_6$ -fructosa-6-fosfato como estándar interno.

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 se probaron esencialmente como se ha descrito anteriormente:

Tabla 1

Número de ejemplo	hASK1 CI_{50} (nM)	hASK1 CI_{50} (nM)
1	9	19
2	27	37

Estos resultados demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 inhiben la actividad enzimática de ambos KHK-C y KHK-A.

Ensayo de actividad celular KHK

La potencia puede medirse utilizando un ensayo celular para la inhibición de la conversión de fructosa en F1P por KHK celular. Las células hepáticas HepG2 se colocan en placas de cultivo celular de 96 pocillos en un medio de crecimiento [medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (HI FBS), 1× Penicilina/estreptomicina] y se dejan fijar durante la noche en una incubadora a 37 °C. El medio de crecimiento se lava y se sustituye por medio de ensayo consistente en Gibco OptiMEM 1 Reduced Serum Medium, 0,1% de Caseína, 8,33mM de D-Fructosa- $^{13}\text{C}_6$, y concentraciones de compuestos que oscilan entre 100 μM y 0,0051 μM (curva de concentración de 10 puntos). Las placas se incuban a 37 °C durante 3 h, tras lo cual se aspira el medio de ensayo de los pocillos de células. A continuación, se añade a las células una solución de parada compuesta por MeOH al 80%, acetato de amonio 2 mM y 50 ng/ml de D-Fructosa- $^{13}\text{C}_6$. Las placas se almacenan a -20°C hasta el análisis RapidFire MS (descrito anteriormente).

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 se probaron esencialmente como se ha descrito anteriormente:

Tabla 2

Número de ejemplo	HepG2 CI_{50}
1	127
2	316

Estos resultados demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 inhiben el metabolismo de la fructosa a F1P.

Procedimiento de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para ensayos farmacocinéticos: Las muestras se extraen utilizando una precipitación de proteínas añadiendo 180 μL de MeOH:ACN (1:1, v/v) conteniendo un estándar interno y 25 μL (muestras de roedores) o 50 μL de (muestras no de roedores) de plasma. A continuación, las muestras se diluyen con MeOH:Agua (1:1, v/v) para obtener concentraciones dentro del intervalo de la curva estándar. Las muestras diluidas se analizan por LC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000 (Applied Biosystems/MDS; Foster City, CA) equipado con una interfaz TurbolonSpray y operado en modo de iones positivos. Los analitos se separan cromatográficamente utilizando una columna Thermo Betasil C18 Sum 20X2,1 mm Javelin (muestras de roedores) o una columna Advantage ECHIELON C18 4 μm 20 mm × 2,1 mm ID (muestras de no roedores). Las condiciones de LC son Agua/1 M de bicarbonato de amonio, (2000:10, v/v) (Fase Móvil A), y MeOH/1 M de bicarbonato de amonio, (2000:10, v/v) (Fase Móvil B).

Farmacocinética en ratones

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* y la implicación del transportador OATP1A/1B en la disposición del Ejemplo 1 se demuestran utilizando ratones FVB de tipo salvaje y ratones knockout OATP1A/1B (Taconic #10707) (en ayunas; n=4/genotipo). El Ejemplo 1 se administra mediante una única dosis intravenosa (IV; 1mg/kg; volumen de 1ml/kg) en vehículo. Se recoge sangre de cada animal a las 0, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 horas después de la dosis. El hígado, el bazo y el páncreas se recogen, pesan y perfunden a las 24 h después de la dosis. Las concentraciones plasmáticas y de tejido del Ejemplo 1 se determinan mediante un procedimiento LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente.

En ratones FVB, el Ejemplo 1 tiene una semivida de 5,43 horas, una media de depuración de 6,91 ml/hr/kg, un volumen de distribución de 2,74 L/kg, con una media de coeficiente de partición hepática no ligada (K_{puu}) de 67,5. En ratones knockout OATP1A/1B, el Ejemplo 1 tiene una semivida de 9,36 horas, una media de depuración de 1,34 ml/hr/kg, un volumen de distribución de 0,986 L/kg, con una media de coeficiente de partición hepática no ligada (K_{puu}) de 24,2. Estos datos muestran que el OATP está implicado en la captación hepática del Ejemplo 1 en el ratón y que la implicación de este transportador afecta a la eliminación.

Farmacocinética en perros

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* del Ejemplo 1 se demuestran utilizando perros Beagle (alimentados, n=3-4). El Ejemplo 1 se administra mediante una única dosis oral (PO; 3 mg/kg; volumen de 2 ml/kg) o intravenosa (IV; 1 mg/kg; volumen de 1 ml/kg) en vehículo. Se extrae sangre de cada animal a las 0, 0,03 (sólo grupo IV), 0,08 (IV), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32 (IV), 48 (IV) y 72 (IV) h después de la dosis. Las concentraciones plasmáticas del Ejemplo 1 se determinan mediante un procedimiento LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente.

Para las dosis PO, la media de semivida del Ejemplo 1 es de 6,9 horas y la biodisponibilidad es de -93%. Para las dosis IV, la media de semivida del Ejemplo 1 es de 7,4 horas y la media de depuración es de 2,52 ml/h/kg con un volumen de distribución bajo (1,33 L/kg). Estos datos muestran que el Ejemplo 1 tiene una depuración total baja, un volumen de distribución bajo y una biodisponibilidad oral alta en perros.

La caracterización de las principales vías de eliminación *in vivo* se demuestra utilizando perros Beagle canulados en el conducto biliar (BDC) (alimentados; n=3). El Ejemplo 1 se administra mediante una única dosis intravenosa (IV; 1 mg/kg; volumen de 1 ml/kg) en vehículo. Se recoge sangre de cada animal a las 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 y 72 horas después de la dosis. Se recoge orina de cada animal a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 32, 48 y 72 horas después de la dosis. Se recoge heces a las 12, 24, 48 y 72 h y las heces a las 24, 48 y 72 h después de la dosis. Las concentraciones de plasma, bilis, orina y heces del Ejemplo 1 se determinan mediante un procedimiento LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente.

La media de semivida del Ejemplo 1 es de 2,9 horas y la media de depuración es de 4,69 ml/h/kg con un volumen de distribución bajo (0,546 L/kg). Los niveles de orina del Ejemplo 1 son insignificantes y el -10% de la dosis administrada por vía intravenosa se recupera en la bilis. Estos datos muestran que el Ejemplo 1 tiene una baja eliminación renal y biliar. En general, la semivida de eliminación en perros canulados biliares, 2,9 h, es más rápida que la semivida medida en perros intactos, 7,4 h, lo que sugiere una recirculación enterohepática.

Farmacocinética en monos *Cynomolgus*

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* del Ejemplo 1 se demuestran utilizando monos *cynomolgus*. El compuesto se administra mediante una única dosis oral (PO; 10 mg/kg; volumen de 5 ml/kg) en vehículo. Se recoge sangre de cada animal a las 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 y 72 horas después de la dosis. Las concentraciones plasmáticas del Ejemplo 1 se determinan mediante un procedimiento LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente.

La media de semivida del ejemplo 1 es de 15,3 horas. Estos datos muestran que el Ejemplo 1 es biodisponible por vía oral y se elimina lentamente en monos.

Depuración intrínseca en hepatocitos humanos (-/+ ABT)

Este procedimiento pretende identificar la depuración metabólica *in vitro* por agotamiento de sustrato en hepatocitos. La incubación en presencia y ausencia de ABT, un inhibidor de la enzima pan-CYP450, se utiliza para estimar la contribución del metabolismo mediado por CYP. Los hepatocitos humanos criopreservados se descongelan a 37 °C, se centrifugan y se reconstituyen en medios de mantenimiento de hepatocitos hasta una densidad de 1×10^6 células viables/ml. En una placa de 96 pocillos precalentada, se añaden 196 μ l de la suspensión de hepatocitos a cada pocillo. Las células se preincuban con y sin ABT de la siguiente manera: para la preincubación con ABT, añadir 2 μ l de solución de ABT 100 mM (añadir a las muestras de control 2 μ l de medio sin ABT), y la placa se incuba a 37 °C durante 30 min bajo agitación constante (~600 rpm). A continuación, añadir 2 μ L de una solución madre 30 μ M del artículo de prueba y a los 0, 15, 30, 60, 120, 240 min tomar alícuotas de 20 μ L y enfriarlas por transferencia a ACN que contenga estándar interno. Tras centrifugación a 4000 rpm durante 30 min, se determinan las concentraciones del sobrenadante mediante LC-MS/MS. La depuración se calcula a partir de la pendiente del % de compuesto restante con el tiempo.

La depuración del Ejemplo 1 es inhibida por ABT en un -12% en hepatocitos humanos, lo que sugiere una implicación limitada de las enzimas CYP en la depuración hepática del Ejemplo 1.

Inhibición de OATP 1B 1 y OATP1B3

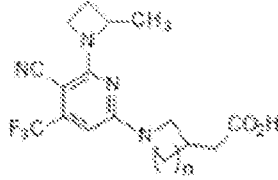
Las células OATP1B1, OATP1B3 y el vector de control (VC) se cultivan en 5% de CO_2 a 37 °C en una atmósfera humidificada en DMEM suplementado con 10% de FBS, 50 μ g/ml de gentamicina y 5 μ g/ml de blasticidina. Las células se siembran en placas BioCoat de Poli-D-Lisina de 24 pocillos. Las células se tratan con butirato sódico 5 mM en DMEM suplementado 24 h antes de la experimentación. Los cultivos celulares se lavan dos veces con PBS precalentado antes de la experimentación. Tras el lavado, todos los tipos celulares se incuban durante 30 minutos a

37 °C en 200 µL de tampón, tampón más una concentración variable del artículo de prueba, o con el inhibidor de control positivo apropiado. Con base en datos preliminares, se prueban concentraciones de 0,025 a 12,5 µM para OATP1B1 y de 0,20 a 100 µM para OATP1B3 (nominal). Al comienzo de la preincubación, se retiran 50 µL de tampón para determinar las concentraciones del artículo de ensayo en el pocillo mediante LC-MS/MS. Tras el periodo de preincubación, se retira el tampón. Los experimentos se inician con la adición de 200 µL de solución de sustrato (400 nM de rosuvastatina en total, incluyendo 1,4 nM de rosuvastatina tritiada). Las incubaciones se realizan con y sin inhibidor. El inhibidor de control positivo utilizado para cada línea celular es rifamicina SV 50 µM. Los experimentos se llevan a cabo durante 1 min a 37 °C, momento en el que se detiene la reacción y se lava por adición de 1000 µL de PBS helado por pocillo. A continuación, se aspira cada pocillo y se lava dos veces más con PBS helado. Las células de cada pocillo se lisan en 400 µL de Triton X 100 al 1% en PBS (en volumen). Se toman muestras de cada pocillo de las placas para contar la radiactividad y se determina la concentración de proteínas en cada pocillo por el procedimiento del ácido bicinónico. Los valores IC_{50} se determinan ajustando los datos mediante GraphPad Prism. Las concentraciones nominales se convierten en concentraciones medidas antes del ajuste.

El Ejemplo 1 inhibió la OATP1B1 más potentemente que la OATP1B3, con valores IC_{50} de 0,12 y 5,5 µM, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



Fórmula 1,

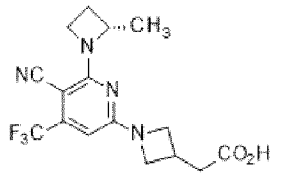
5

en el que n es 1 o 2; o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que compuesto es:

10

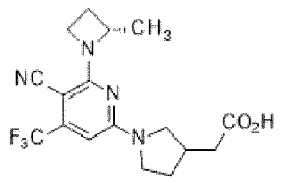


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 2, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

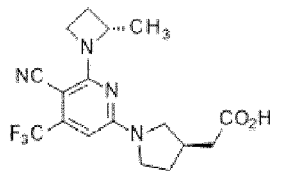
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que compuesto es:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que compuesto es:



25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en terapia.
8. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.
- 5 9. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.
10. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética.
- 10 11. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica.
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 13. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, con uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.