

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 475**

51 Int. Cl.:

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2014** **PCT/IN2014/000507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015** **WO15015519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2014** **E 14789631 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 3027605**

54 Título: **Nuevos compuestos de indazol y un proceso para la preparación de éstos**

30 Prioridad:

31.07.2013 IN 2296DE2013

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (50.0%)**

Anusandhan Bhawan, 2

Rafi Marg New Delhi 110 001, IN y

**SHANTANI PROTEOME ANALYTICS PVT. LTD
(50.0%)**

72 Inventor/es:

REDDY, DUMBALA, SRINIVASA;

SAXENA, CHAITANYA y

KOMIRISHETTY, KASHINATH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 656 475 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

Nuevos compuestos de indazol y un proceso para la preparación de estos

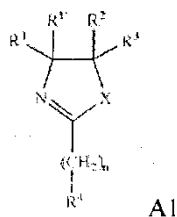
5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a nuevos compuestos de indazol de Fórmula general I, y un proceso para la preparación de estos. La invención se refiere específicamente a nuevos compuestos de indazol, derivados de estos y a procedimientos para sintetizarlos. Además, la invención se refiere al uso de indazol novedoso de Fórmula general 1 para el tratamiento de la diabetes, complicaciones diabéticas, trastornos metabólicos, disfunción cardiovascular que incluye hipertensión, trastornos autoinmunes e inflamatorios o enfermedades en donde está presente la reducción de la glucosa deteriorada y el desequilibrio del gasto de energía entre la ruta del ácido graso y la glucosa y también a las composiciones farmacéuticas que los comprenden.

15 Antecedentes y técnica anterior de la invención

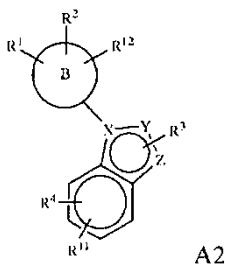
La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una de las enfermedades más comunes, crónicas y potencialmente mortales. Cada año, la prevalencia de DM2 está aumentando en todo el mundo y, recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) predijo que para 2030, el número de pacientes diagnosticados con DM2 será de más de 366 millones. Clínicamente, la DM2 se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre, ya sea por un defecto en la secreción de insulina, resistencia a la insulina o ambos.

El documento US 2004/0009976 A1 describe un compuesto de la Fórmula (A1):



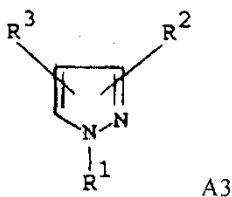
y su uso para el tratamiento de la diabetes tipo II y estimular la secreción de insulina en mamíferos.

El documento US 2003/0109550 A1 describe un compuesto de la Fórmula A2,



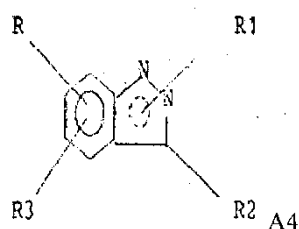
en donde, B es un heterociclo de 5 o 6 miembros saturado o insaturado en donde dicho heterociclo está opcionalmente sustituido con R¹, R², y R¹²; X se selecciona del grupo que consiste en: N y C; Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: N, CH, CR³, S, y O; R³ se selecciona del grupo que consiste en: amidina sustituida o no sustituida, alquilamino, aminoalquilo, CONHR⁷, NH₂, NHCOR⁶, y CH₂NHCOR⁶.

EP 0418845 B1 describe nuevos derivados de pirazol, procedimientos para su preparación y composición farmacéutica que comprende los mismos. Proporciona un compuesto de la Fórmula A3:

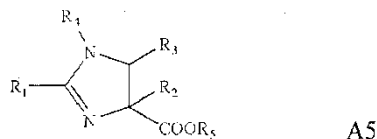


En donde, R1 es arilo que puede estar sustituido con sustituyente(s) seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, halógeno, alcoxi inferior, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, hidroxilo, alquilsulfonilo inferior, nitro, amino, alquilamino inferior, acilamino y alquil- (acil)amino inferior; o un grupo heterocíclico; R2 es hidrógeno; metilo sustituido con amino, alquilamino inferior, halógeno o aciloxi; acilo; acilamino; ciano; halógeno; alquiltio inferior; alquilsulfinilo inferior; o un grupo heterocíclico; y R3 es arilo sustituido con alquilo inferior, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, halógeno, amino, alquilamino inferior, acilamino, alquilo inferior(acilo)amino, alcoxi inferior, ciano, hidroxilo o acilo; o un grupo heterocíclico que puede estar sustituido con alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior o alquilsulfonilo inferior.

US 4,436,913 describe derivados de 1H- y 2H-indazol y productos farmacéuticos que contienen estos derivados de indazol 1H y 2H que disminuyen la presión sanguínea de la Fórmula A4,

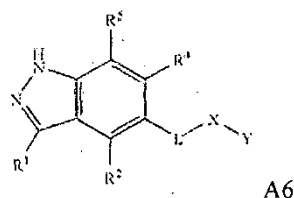


y sus sales de adición de ácido, en donde R1 puede estar en la posición 1 o posición 2 en los átomos de nitrógeno en la Fórmula 1. Los grupos R1, R2 y R3 representan hidrógeno o los grupos moleculares inferiores usuales. El grupo R es un grupo 2 imidazolinilamino o un grupo 3,4,5,6-tetrahidropirimidinilamino, en el que estos grupos también pueden estar presentes en sus formas tautoméricas. Estos grupos también pueden estar en un grupo arilo en el grupo R1, en cuyo caso el grupo R también puede ser un átomo de halógeno. R solo puede representar uno de los grupos amino heterocíclicos secundarios o terciarios en la posición 4 o 7 para los derivados de 1H indazol cuando el grupo R1 es simultáneamente un grupo arilo o aralquilo. El documento US 6,878,735 B2 describe una imidazolina de la Fórmula A5,



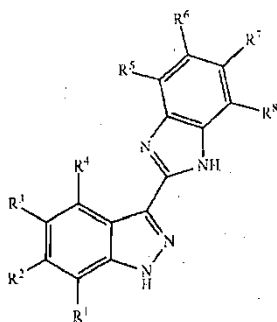
En donde R1 es arilo, opcionalmente sustituido, R2 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo que contiene de 5 a 14 miembros en el anillo, y heterocíclico que contiene de 5 a 12 miembros en el anillo; R3 es arilo, opcionalmente sustituido, R4 es aralquilo, opcionalmente sustituido, y R5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos.

El documento US 7,541,376 B2 proporciona un nuevo compuesto de 1H-indazol que tiene una acción inhibidora de JNK excelente. Más específicamente, proporciona un compuesto representado por la Fórmula A6,



En donde R1 es un grupo hidrocarburo aromático cíclico C6-C14 etc.; R2, R4 y R5 cada uno representa independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo ciano etc.; L es un enlace simple, o un grupo C1-C6alquilenos etc.; X es un enlace simple, o un grupo representado por --CO-NH- o -NH-. CO-, etc.; y Y es un grupo C3-C8 cicloalquilo, un grupo hidrocarburo C6-C14 cíclico aromático o un grupo heterocíclico aromático de 5- a 14- miembros etc., una sal de estos o un hidrato de ellos.

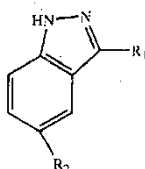
US 2011/0034441 A1 describe un compuesto de la Fórmula A7,



A7

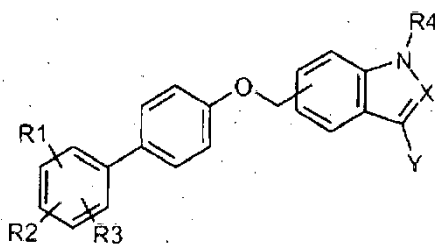
en donde R^1 , R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente seleccionados del grupo que consiste en H, C_{1-9} alquilo, haluro, $-CF_3$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{carbocicliilR}^{12}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{heterocicliilR}^{12}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{arilR}^{12}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{heteroarilR}^{12}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{OR}^9$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{SR}^9$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{S(=O)R}^{10}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{SO}_2\text{R}^9$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{N(R}^9\text{)S(=O)R}^{10}$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{N(R}^9\text{)SO}_2\text{R}^9$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{SO}_2\text{N(R}^9)_2$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{N(R}^9)_2$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{N(R}^9\text{)C(=A)N(R}^9)_2$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{R}^9\text{C(=O)OR}^9$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{C(=A)N(R}^9)_2$, $-(C_{1-9}\text{ alquilo})_n\text{N(R}^9\text{)C(=A)R}^9$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{OC(=O)N(R}^9)_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{CO}_2\text{R}^9$ y $-(C_{1-9}\text{alquilo})_n\text{C(=A)R}^9$.

US 2002/0161022 A1 describe un compuesto de la Fórmula A8,



A8

en donde R_1 es un alquilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo sustituido o no sustituido, etc.; R_2 es un alquilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo sustituido o no sustituido, etc. El documento WO2011057959 describe un compuesto de la Fórmula A9,



A9

en donde, R_1 , R_2 , R_3 , independientemente uno de otro, es hidrógeno, halógeno, alquilo inferior o alcoxi; R_4 es hidrógeno, alquilo inferior no sustituido, o alquilo inferior sustituido con uno a cuatro sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en metilo, $(=O)$ y $-\text{COOH}$; X es CH o N ; y Y es hidrógeno o $-\text{NH}_2$, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos. Además, se relaciona con el uso del compuesto A9, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades y trastornos metabólicos.

El artículo titulado, "2-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)indazole (indazim) derivatives as selective 12 imidazoline receptor ligands" de F. Saczewski y otros, en European Journal of Pharmaceutical Sciences 20 (2003) 201-208 informa la síntesis de una serie de 2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)indazols y 2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-4,5,6,7-tetrahidroindazol. Además, informa que 4-cloro-2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)indazol (3f, 4-Cl-indazim) que muestra buena afinidad en el receptor de imidazolina I2 y sin precedentes entre este tipo de ligandos de imidazolina de baja afinidad en el alfa-2-adrenoreceptor.

El artículo titulado, "Click" synthesis of small molecule-peptide conjugates for organelle-specific delivery and inhibition of lysosomal cysteine proteases" de YuhuiLoh en Chem Commun (Camb). 2010 nov 28;46 (44):8407-9 reporta un enfoque de química clic para la síntesis de conjugados inhibidor de molécula pequeña-péptido para lograr la administración específica de orgánulos. Además, proporciona un proceso en el que el grupo COOH se convirtió en $-\text{CONNH}_2\text{ME}$ usando N-metilmorfolina (NMM), cloroformiato de isobutilo (ISCF) y sal de metilhidrazina.

El artículo "Carboxylic Compounds, Nitriles, and Their Interconversion" en Organic Mechanisms, 2010, págs. 321-338 reporta la deshidratación mediada por anhídrido de ácido trifluoroacético de amida de ácido pivalico (A) a nitrilo de ácido pivalico (B) con el reactivo que forma ácido trifluoroacético F_3C-CO_2H .

El artículo titulado, "Synthesis and antidiabetic activity of 2,5-disubstituted-3-imidazol-2-yl-pyrrolo[2,3-b]pyridines and thieno[2,3-b]pyridines" de Rajesh H. Bahekar, Mukul R. Jain, Pradip A. Jadav, Vijay M. Prajapati, Dipam N. Patel, Arun A. Gupta, Ajay Sharma, Robby Tom, Debdutta Bandyopadhyay, Honey Modi y Pankaj R. Patel en Bioorganic & Medicinal Chemistry 15 (2007) 6782-6795 reporta la conversión de nitrilos a imidazolina usando etilendiamina, P_2S_5 a $120^\circ C$ y 5 h.

Los fármacos usados en la terapia de la diabetes pertenecen a las siguientes clases terapéuticas, definidas sobre la base del papel patogénico de la resistencia a la insulina (Trends in Pharm. Sci. 21, 259-265 2000): insulina, sulfonilureas, metformina, inhibidores de alfa-glucosidasa (acarbosa) y tiazolidindionas (troglitazona). La insulina es el fármaco más conocido y se considera el medicamento de referencia en el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, la terapia con insulina tiene los siguientes inconvenientes: el fármaco es administrable solo por vía parenteral, es necesario controlar constantemente los niveles de glucemia, pueden aparecer reacciones alérgicas locales, la resistencia a la insulina obliga a aumentar significativamente la dosis del fármaco durante el tiempo, la tolerabilidad es pobre.

Además, los otros enfoques terapéuticos tienen sus inconvenientes, a veces incluso son notables. Por ejemplo, las sulfonilureas, que se administran solas o en combinación con insulina o con otros fármacos hipoglucemiantes orales, pueden causar hipoglucemia. La metformina, que se usa sola o en combinación con sulfonilurea, está contraindicada en presencia de enfermedades renales y hepáticas, y puede inducir un estado de acidosis láctica. La acarbosa se usa sola o en combinación con sulfonilurea para reducir los niveles de glucemia posprandial, pero a menudo induce efectos secundarios a nivel del sistema gastrointestinal. La troglitazona, que solamente se usa en combinación con insulina, puede inducir efectos hepatotóxicos.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar algunos nuevos enfoques terapéuticos para el control de la glucemia que puedan intentar conservar la respuesta fisiológica normal a la ingesta de comida. Uno de estos enfoques se basa en el desarrollo de secretagogos de insulina, que no causan secreción de glucosa bajo niveles basales de glucosa en sangre, pero sólo muestran liberación de insulina dependiente de glucosa.

Considerando los problemas existentes en la técnica anterior y la necesidad sentida desde hace mucho tiempo de un nuevo fármaco que muestre la liberación de insulina dependiente de glucosa, superar los efectos secundarios para el tratamiento de la diabetes o las complicaciones relacionadas con la diabetes, los inventores han presentado la presente invención. La presente invención divulga nuevos compuestos de indazol, derivados de estos y un método para sintetizarlos. Los compuestos muestran actividad antidiabética contra la diabetes de tipo 1 y tipo 2 y complicaciones relacionadas, como la neuropatía diabética, la retinopatía diabética y una variedad de enfermedades vasculares que son resultado de los continuos niveles fluctuantes de glucosa en sangre.

Objetivos de la invención:

El objeto principal de la invención es proporcionar nuevos compuestos de indazol de la Fórmula general 1.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un proceso para sintetizar los compuestos de la Fórmula 1.

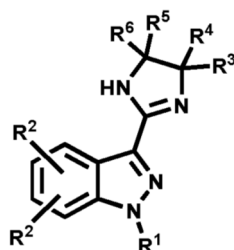
Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas de los compuestos para tratar la diabetes, complicaciones relacionadas con la diabetes e hipertensión.

Aún otro objetivo de la invención es proporcionar el uso de un indazol novedoso de la Fórmula general 1 para el tratamiento de la diabetes, complicaciones diabéticas, trastornos metabólicos, disfunción cardiovascular que incluye hipertensión, enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con la inflamación donde la reducción de la glucosa y el desequilibrio del gasto de energía entre los ácidos grasos y la vía de la glucosa y el nivel de triglicéridos asociado está presente.

Resumen de la invención:

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona compuestos de indazol de la Fórmula 1,



Fórmula 1

5 En donde:

R¹ son hidrógeno o alquilo o arilo o heteroarilo;

R² son H o halógeno

10 R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente hidrógeno o alquilo, arilo, heteroarilo; dos grupos adyacentes seleccionados de R³, R⁴, R⁵, y R⁶ puede formar un ciclo de 3-8 miembros que además puede contener heteroátomos; y sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En una modalidad de la presente invención, los compuestos de indazol de la Fórmula 1 están representados por los siguientes compuestos

- 15 a. 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 b. 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-3a,7a-dihidro-1H-indazol;
 c. 5-Cloro-3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol ;
 d. 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-etil-1H-indazol;
 e. 1-Bencil-5-cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 f. 3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 20 g. 3-(4, 5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-1H-indazol;
 h. 3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol.

En una modalidad de la presente invención un proceso para la preparación de un compuesto de indazol de la Fórmula 1, en donde dicho proceso comprende las etapas de;

- 25 i. convertir 5-Cloro isatin (1) en ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2);
 ii. tratar el compuesto ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2) con cloroformiato de isobutilo y N-metilmorfolina bajo argón seguido por la reacción con amoníaco ac. para obtener 5-Cloro-1H-indazol-3-carboxamida (3);
 30 iii. tratar el compuesto 5-cloro-1H-indazol-3-carboxamida (3) con piridina y anhídrido trifluoroacético para obtener compuesto ciano (4);
 iv. reaccionar el compuesto ciano (4) con carbonato de potasio y haluro de alquilo en un solvente seleccionado de acetona para obtener indazolcarbonitrilo sustituido;
 v. reaccionar indazolcarbonitrilo sustituido con diamina en presencia de P₂S₅ para obtener compuestos de la Fórmula general 1

35 En otra modalidad de la presente invención, el haluro de alquilo usado en la etapa (iv) se selecciona del grupo que consiste en bromuro de etilo, yoduro de metilo, bromuro de bencilo.

40 En otra modalidad de la presente invención, la diamina usada en la etapa (v) se selecciona del grupo que consiste en 1,2-ciclohexanodiamina, etilendiamina.

En otra modalidad de la presente invención una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula 1 como un ingrediente activo, o sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable de estos, junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

45 En otra modalidad de la presente invención, los compuestos de indazol de la Fórmula 1 son útiles para el tratamiento de la diabetes, complicaciones diabéticas, trastornos metabólicos, disfunciones cardiovasculares o enfermedades relacionadas donde la reducción de la glucosa deteriorada, alteración de los niveles de triglicéridos o reducción de las funciones de las células beta está presente.

50 En otra modalidad de la presente invención, se encuentran los compuestos de indazol de la Fórmula 1, o sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable, en donde dichos compuestos son para administración a un mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.

55 Breve descripción de las figuras

Figura 1: representa la capacidad de secreción de insulina de NDS100178 y NDS100179 en tres días diferentes.

Figura 2: representa la actividad dependiente de glucosa de NDS100178 y NDS100179,

Figura 3: representa la actividad insulínica de NDS100178 y NDS100179 a bajas concentraciones.

Figura 4: representa a) Prueba de tolerancia oral a la glucosa: Reducción de la glucosa plasmática en presencia de NDS100179 en ratones C57BL b) Prueba de tolerancia oral a la glucosa: NDS100179 % de cambio dependiente de la dosis en el AUC total (glucosa) en ratones C57BL.

Figura 5: representa a) mejora de GSIS en islotes humanos; b) mejora de GSIS en ratones C57BL; c) mejora de GSIS en células MIN6.

Figura 6: representa a) Control glucémico en ratones db/db tratados con NDS100179; b) Tolerancia a la glucosa en ratones db/db tratados con NDS100179; c) mediciones del peso corporal del control o ratones db/db tratados con NDS100179.

Figura 7: Medición de triglicéridos en ratones db/db control o tratados con NDS100179; b) Mediciones de función de células beta en ratones db/db control o tratados con NDS100179.

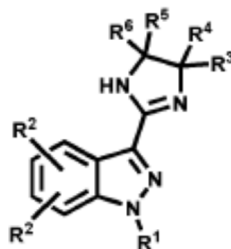
Figura 8: describe la captación de glucosa en células HepG2.

Figura 9: representa PK de NDS 100179 en ratones C57BL/6JRcchsd.

Figura 10: representa la Prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratones C57BL/6JRcchsd.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se relaciona con nuevos compuestos de indazol de la Fórmula general 1 y un proceso para su preparación. La presente invención proporciona nuevos compuestos y sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable de estos de los compuestos de indazol de la Fórmula general 1



Fórmula 1

En donde:

R¹ son hidrógeno o alquilo o arilo o heteroarilo;

R² son H o halógeno

R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente hidrógeno o alquilo, arilo, heteroarilo; dos grupos adyacentes seleccionados de R³, R⁴, R⁵, y R⁶ pueden formar un ciclo de 3-8 miembros que además puede contener heteroátomos; y sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula 1 seleccionado del grupo de:

5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol (NDS100178);

5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-3a,7a-dihidro-1H-indazol (7, NDS100179);

5-Cloro-3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol (8, NDS100281);

5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-etil-1H-indazol (10, NDS100282);

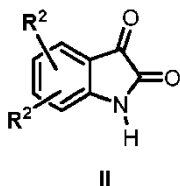
1-Bencil-5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol 12 (NDS100283);

3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol (16, NDS100277);

3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-1H-indazol 18 (NDS100278);

3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol (19, NDS100279).

En otra modalidad, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de nuevos compuestos de la Fórmula I, a partir del compuesto de isatina de la Fórmula II,



en donde R² son H o halógeno;

que comprende las etapas de:

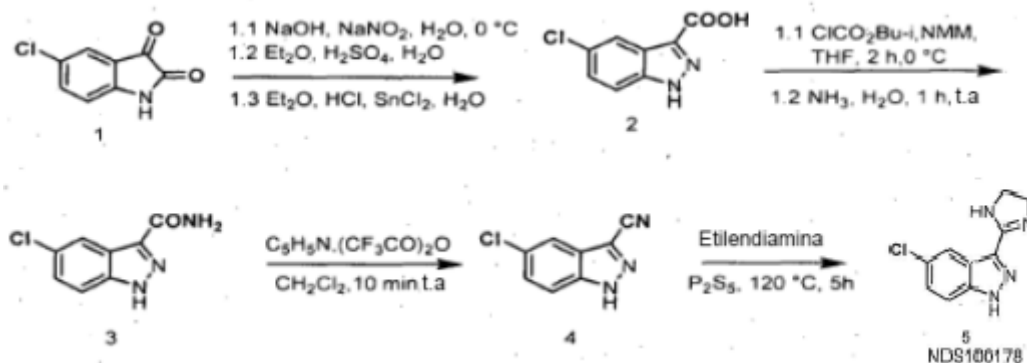
- Convertir el compuesto de isatina de la Fórmula (II) en ácido carboxílico;
- Tratar el compuesto de ácido carboxílico de la etapa (a) con cloroformiato de isobutilo y N-metilmorfolina seguido de la reacción con amoníaco ac. para obtener amida;
- Tratar el compuesto de amida de la etapa (b) con piridina y anhídrido trifluoroacético para proporcionar compuesto ciano;
- Reaccionar el compuesto ciano de la etapa (c) con diamina en presencia de P₂S₅ para dar el compuesto deseado de la Fórmula (1).

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de nuevos compuestos de la Fórmula 5, que comprende:

- Convertir 5-cloro isatin(1) en ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2);
- Convertir el compuesto (2) de la etapa (a) en la amida (3);
- Tratar la amida 3 de la etapa (b) con piridina y anhídrido trifluoroacético para proporcionar el compuesto ciano (4);
- Reaccionar el compuesto (4) de la etapa (c) con etilendiamina en presencia de P₂S₅ para dar el compuesto (5).

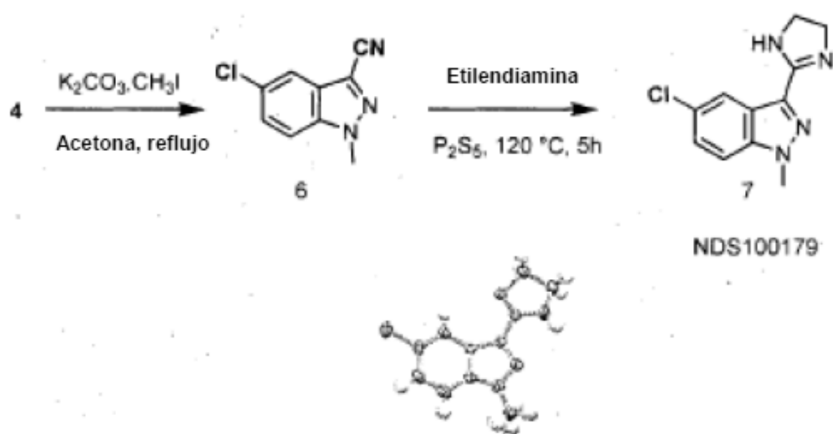
El proceso para la preparación del compuesto 5 se representa en el esquema 1.

Esquema 1:



En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de la Fórmula I, que comprende:

- Convertir 5-cloro isatina (1) en ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2);
 - Convertir el compuesto (2) de la etapa (a) en amida (3);
 - Tratar la amida 3 de la etapa (b) con piridina y anhídrido trifluoroacético para proporcionar el compuesto ciano (4);
 - Metilar el compuesto (4) de la etapa (c) para obtener el compuesto (6),
 - Reaccionar el compuesto (6) de la etapa (c) con etilendiamina en presencia de P₂S₅ para dar el compuesto (7).
- El proceso para la preparación del compuesto 7 se representa en el esquema 2:



ORTEP de NSD-100179

Esquema: 2

El proceso descrito en la invención tiene alto rendimiento y selectividad y es comercialmente factible.

En un aspecto de la invención, el compuesto de la Fórmula 1 puede poseer actividad antidiabética contra la diabetes tipo 1 y tipo 2 y complicaciones relacionadas como neuropatía diabética, retinopatía diabética y una variedad de enfermedades cardiovasculares que son el resultado de la fluctuación continua de los niveles de glucemia y triglicéridos.

En un aspecto de la invención, los compuestos de Fórmula 1 se estudiaron por su actividad insulínica. Los compuestos de la Fórmula 1 exhibieron actividades insulínicas en un intervalo de 0.1 a 10 µg/ml. Los compuestos de Fórmula 1 exhibieron actividad insulínica dependiente de la concentración.

En otro aspecto, la actividad insulínica de los compuestos de Fórmula 1 se comparó con la actividad de compuestos previos de US 20040009976 y los resultados son los que figuran en la Tabla 1. Los compuestos de la Fórmula 1 exhiben actividad insulínica potenciada en comparación con los descritos en las técnicas anteriores.

Aún en otro aspecto, los inventores estudiaron la secreción de insulina dependiente de la concentración de glucosa o la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en varios modelos. El estudio se realizó en islotes humanos, ratones C57BL y células MIN 6. Los compuestos de la Fórmula 1 inducen GSIS y esto es evidente haciendo referencia a la Figura 5. La prueba confirma además que el efecto GSIS de los compuestos de la invención es independiente del sistema biológico y su composición.

Además en los estudios, el compuesto de Fórmula 1 proporcionó un control excelente sobre el aumento de los niveles de glucosa en sangre en ayunas y la tolerancia a la glucosa mejorada en pruebas OGTT en modelos animales de diabetes (ratones db/db) cuando los animales se trataron durante 30 días con el compuesto. Esto proporciona una indicación directa de las propiedades antidiabéticas del compuesto de Fórmula 1 (Figura 6a y 6b). Además, las funciones de las células beta se preservaron/restauraron mejor en el animal tratado con el compuesto, lo que confirma el beneficio adicional del compuesto (Figura 6c).

Incluso en otro descubrimiento, el compuesto de la Fórmula 1 disminuyó los niveles de triglicéridos en el modelo animal de diabetes (ratones db/db) cuando los animales se trataron durante 30 días con el compuesto (Figura 7). Los niveles bajos de triglicéridos están relacionados con la salud cardíaca mejorada y el compuesto proporciona beneficios cardiovasculares terapéuticos significativos.

Con referencia a la Figura 8, se estudió la captación de glucosa por las células HepG2 en presencia del compuesto. La captación de glucosa por las células HepG2 representa un modelo de estudio de la captación de glucosa por las células hepáticas. El aumento de la captación de glucosa se caracteriza por una mejor sensibilidad a la insulina y los compuestos que pueden estimular la captación de glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina son útiles en el tratamiento de la diabetes tipo 2 ya que ayudan a mantener la homeostasis de glucosa al disminuir la glucosa del sistema circulante. Como resulta evidente, el compuesto aumenta la captación de glucosa en células HepG2 y, por lo tanto, representa un compuesto que puede ayudar a mantener la homeostasis de la glucosa y controlar la diabetes tipo 2.

En otro aspecto adicional, los inventores proponen el mecanismo de acción de los compuestos de la Fórmula 1. Trabajando a través del receptor de imidazolina, el compuesto aumenta el diacilglicerol y los ácidos araquidónicos aguas abajo en la célula. Los metabolitos del ácido araquidónico están implicados en la exocitosis de la insulina. Un nuevo descubrimiento de que la inhibición del LTA4H, una enzima que puede mantener el conjunto de ácido

araquidónico en la célula, puede potenciar la secreción de insulina ha sido establecido por los inventores. NDS100178 inhibe el LTA4H ($IC_{50} < 500$ nM) mientras que el IC_{50} contra el LTA4H objetivo del ejemplo 6 de la patente US20040009976 Compuesto: 5-Cloro-2-metil-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indole) está por encima de 10 μ M.

Aún en otra modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o un estereoisómero, o éster o sal farmacéuticamente aceptable de estos, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar mediante la combinación de un compuesto de la invención con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, inyecciones, geles y microesferas,

En otra modalidad adicional, la "composición de la invención" se puede administrar en una "cantidad efectiva" a un sujeto que padece dicha enfermedad. Por consiguiente, el compuesto de la Fórmula 1, las composiciones farmacéuticas que los contienen se pueden administrar usando cualquier cantidad, cualquier forma de composición farmacéutica por cualquier vía de administración efectiva para tratar la enfermedad. Las rutas típicas de administración de tales composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, la vía oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para permitir que los ingredientes activos contenidos en ellas estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación. Las formas de dosificación también pueden prepararse como formas de dosificación sostenidas, controladas, modificadas e inmediatas.

En conclusión, puede afirmarse que los compuestos de la Fórmula 1 proporcionan una nueva alternativa a los diabéticos y sujetos que sufren sus complicaciones al inducir GSIS, controlar las concentraciones de glucosa en sangre proporcionales al peso corporal del sujeto y la concentración administrada, mejorar el perfil de seguridad cardiovascular con disminución en los triglicéridos y restauración/preservación de las funciones de las células beta.

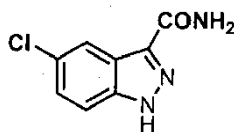
Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración del funcionamiento de la invención en la práctica real y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo: 1

5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol (NDS100178):

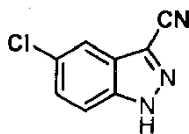
5-Cloro-1H-indazol-3-carboxamida (3):



3

A una solución de ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico¹ 2 (0.8 g, 4.0 mmol) en THF anhidro (20 mL) se añadió cloroformiato de isobutilo (0.64 mL, 4.9 mmol) y N-metilmorfolina (0.7 mL, 6.1 mmol) bajo argón a 0° C y la mezcla se agitó por 2h. Después, a esta mezcla 10 mL de NH₃ acuoso se añadió y la mezcla se agitó a 25°C por 1h. El THF se eliminó a presión reducida, el sólido se filtró a través del embudo Buchner, el sólido se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título 3 (0.5 g, 63%) en forma de un sólido amarillo pálido. IR U_{max} (película): cm^{-1} 2925, 2854, 1463; ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ 8.14 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.80 (bs, 1H), 7.66 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.45-7.39 (m, 2H); MS: 218 (M+Na)⁺.

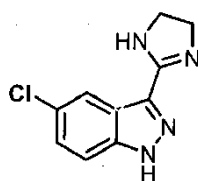
5-Cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo (4):



4

5-Cloro-1H-indazol-3-carboxamida 3 (0.60 g, 3.0 mmol) se disolvió en piridina (6 mL) y diclorometano seco (6 mL). Anhídrido de ácido trifluoroacético (1.0 mL, 7.7 mmol) se añadió y la reacción se agitó a 25°C por 10 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo, luego se lavó con agua, bicarbonato sódico saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar el compuesto del título 5-Cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.5 g, 92 %) como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (dd, *J* = 5.98, 8.06 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 0.92, 8.12 Hz, 1H), 3.93 (d, *J* = 1.42 Hz, 3H), 1.36 (s, 12H).

10 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol (5, NDS100178) :



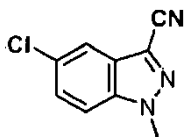
5

NDS100178

15 Una mezcla de 5-Cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.2 g, 1.1 mmol), etilendiamina (EDA, 4 mL), y P₂S₅ (0.1 g, 0.4 mmol) se calentó a 120° C por 5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo, se obtuvo un sólido, se filtró a través de un embudo Buchner, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar 5-cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol compuesto 5 NDS100178 (0.12 g, 49%) como un sólido blancuzco. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 9.52 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.63 (s, 3H). 221 (M+H)⁺. Ejemplo: 2

20 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-2-metil-2H-indazol (NDS100179)

5-Cloro-1-metil-1H-indazol-3-carbonitrilo (6):



6

25 Se añadieron carbonato de potasio (0.23 g, 1.6 mmol) y yoduro de metilo (0.1 mL, 1.6 mmol) a una suspensión de 5-cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.1 g; 0.5 mmol) en acetona (10 mL). La mezcla de reacción se calentó a 65 ° C durante 4 h, se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice malla 100-200, 3:7 acetato de etilo: éter de petróleo) para proporcionar 5-cloro-1-metil-1H-indazol-3-carbonitrilo 6 (0.8 g, 75%) como un sólido blanco. Mp = 154 - 155 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 8.03 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H), 4.20 (s, 3H).

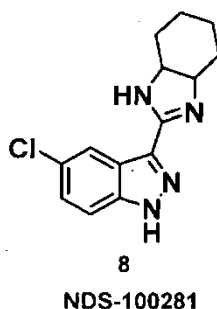
30 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-3a,7a-dihidro-1H-indazol (7, NDS100179):

35 Una mezcla de 5-Cloro-1-metil-1H-indazol-3-carbonitrilo 6 (0.1 g, 1.0 mmol), EDA (4 mL), y P₂S₅ (0.046 g, 0.4 mmol) se calentó a 120° C por 5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo, se obtuvo un sólido, se filtró a través de un embudo Buchner, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar el compuesto 7 (NDS100179) (0.060 g, 50%) como un sólido blanco. Mp = 174 - 175 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 8.21 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.84 (bs, 1H), 4.11 (s, 3H), 3.62 (bs, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 160.1, 139.6, 132.0, 128.2, 127.2, 122.4, 120.1, 111.2, 35.2; MS; 235(M+H)⁺.

40 Ejemplo: 3

45 5-Cloro-3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol (NDS100281):

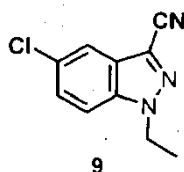
8



Una mezcla de 5-cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.1 g, 0.5 mmol), 1,2-ciclohexanodiamina (2 mL), y P_2S_5 (0.05 g, 0.2 mmol) se calentó a 120° C por 5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo, se obtuvo un sólido, se filtró a través de un embudo Buchner, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar 5-cloro-3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol NDS100281 (60 mg, 40%) como un sólido amarillo pálido. 1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ = 8.08 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.23 (dd, J = 2.0, 8.9 Hz, 1 H), 3.89 (t, J = 3.6 Hz, 2 H), 1.88 - 1.29 (m, 2 H); MS; 275(M+H) $^+$.

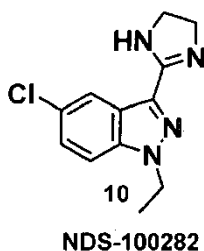
Ejemplo: 4

5-Cloro-1-etil-3a,7a-dihidro-1H-indazol-3-carbonitrilo, (9):



Se añadieron carbonato de potasio (0.28 g, 1.8 mmol) y bromuro de etilo (0.2 ml, 1.8 mmol) a una suspensión de 5-cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.12 g; 0.6 mmol) en acetona (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a 65 °C por 4 h, se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice malla 100-200, 2:8 acetato de etilo: éter de petróleo) para proporcionar 9 (0.13 g, 94%) como un sólido amarillo pálido. 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.82 (t, J = 1.1 Hz, 1 H), 7.47 (s, 2 H), 4.49 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 1.57 (t, J = 7.3 Hz, 4 H); MS; 206(M+H) $^+$.

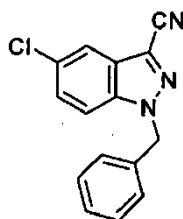
5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-etil-1H-indazol (10) NDS100282:



Una mezcla de 9 (150 mg, 0.7 mmol), EDA (4 mL), y P_2S_5 (0.065 g, 0.3 mmol) se calentó a 120° C por 5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo, se obtuvo un sólido, se filtró a través de un embudo Buchner, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar (10) NDS 100282 (0.11 g, 60%) como un sólido blancuzco. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.12 (s, 1H), 7.68 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 2.0, 9.0 Hz, 1H), 4.53 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 3.95 (s, 4H), 1.58 - 1.46 (m, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ = 159.9, 138.8, 130.4, 128.7, 127.4, 122.4, 119.7, 111.5, 44.5, 13.6; MS; 249(M+H) $^+$.

Ejemplo: 5

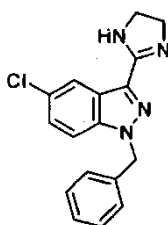
1-Bencil-5-cloro-3a,7a-dihidro-1H-indazol-3-carbonitrilo (11) :



11

Carbonato de potasio (0.35 g; 2.5 mmol) y bromuro de bencilo (0.3 mL; 2.5 mmol) se añadieron a una suspensión de 5-cloro-1H-indazol-3-carbonitrilo 4 (0.15 g; 0.8 mmol) en acetona (10 mL). La mezcla de reacción se calentó a 65 °C por 4 h, se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice malla 100-200, 2:8 acetato de etilo: éter de petróleo) para proporcionar (11) (0.18 g, 80 %) como un sólido amarillo pálido. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.83 (t, J = 1.2 Hz, 1 H), 7.41 - 7.29 (m, 5 H); 7.25 - 7.19 (m, 2 H), 5.64 (s, 2 H); MS; 268(M+H) $^+$.

1-Bencil-5-cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol 12 (NDS100283):



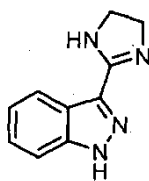
12

NDS-100283

1-Bencil-5-Cloro-3a,7a-dihidro-1H-indazol-3-carbonitrilo 11 (160 mg, 0.6 mmol), EDA (4 mL), y P_2S_5 (0.053 g, 0.2 mmol) se calentó a 120 °C por 5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo se obtuvo un sólido, se filtró a través de un embudo Buchner se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para proporcionar 12 (NDS100283) (0.100 g, 54%) como un sólido blancuzco. ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ = 8.26 - 8.11 (m, 1 H), 7.50 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 1.8, 8.9 Hz, 1H), 7.29 - 7.17 (m, 5H), 4.91 (s, 2H), 3.78 (s, 4H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ = 160.3, 139.1, 136.3, 134.2, 128.4, 127.9, 127.6, 127.2, 127.0, 122.9, 120.8, 111.2, 52.9, 48.9; MS 311(M+H) $^+$.

Ejemplo: 6

3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol (16) NDS100277:

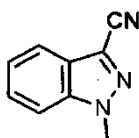


16

NDS-100277

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la síntesis de 5(NDS100178). Rendimiento : 51%; ^1H NMR (200MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.25 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.67 - 7.55 (m, 1H), 7.48 - 7.35 (m, 1H), 7.23 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.66 (s, 4H); ^{13}C NMR (50MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 159.8, 141.1, 135.8, 126.2, 122.0, 121.4, 121.1, 11-0.5, 49.4; MS 187 (M+H) $^+$.

1-Metil-1H-indazol-3-carbonitrilo 17:

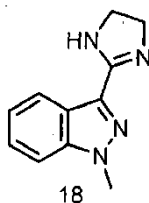


17

Siguiendo el procedimiento para la síntesis de 6. Rendimiento: 97%; ^1H NMR (200MHz CDCl_3) δ = 7.84 (td, J = 0.9, 8.2 Hz, 1 H), 7.57 - 7.47 (m, 2 H), 7.37 (dd, J = 4.0, 8.0 Hz, 1 H), 4.17 (s, 3 H); MS 158 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5 Ejemplo: 7

3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-1H-indazol 18 (NDS100278):



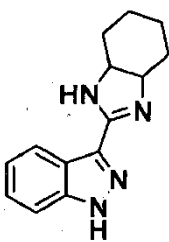
18

NDS100278

10 Siguiendo el mismo procedimiento para la síntesis de 7 (NDS100179). Rendimiento: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (d, J = 0.6 Hz, 2H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), 6.96 – 6.89 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.12 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.06 (d, J = 8.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.46, 135.08, 134.23, 130.91, 129.85, 129.16, 125.42, 114.02, 64.67, 55.32, 39.62, 38.48.

15 Ejemplo: 8

3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol (19) NDS100281:



19

NDS-100279

20 Siguiendo el mismo procedimiento para la síntesis de 8. Rendimiento :30%; ^1H NMR (200MHz, CD_3OD) δ = 8.09 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 7.56 - 7.43 (m, 1 H), 7.31 (s, 1 H), 7.16 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 3.6 Hz, 2 H), 1.84 - 1.24 (m, 8 H); ^{13}C NMR (50MHz, CD_3OD) δ = 162.1, 143.7, 135.9, 127.7, 123.3, 122.5, 122.2, 112.0, 60.5, 28.9, 21.8; MS 241 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ejemplo 9:

25

Medición de la actividad insulínica de NDS100178 y NDS100179

Materiales y Métodos

30 La actividad insulínica de NDS100178 y NDS100179 se midió mediante un ensayo basado en ELISA bien optimizado (Shantani Protocolo n° 5205) descrito a continuación.

Materiales

- 35
- Células MIN6 (fuente: National Center for Cell Sciences, Pune)
 - Kit de ELISA para Insulina de Ratón (Mercodia,10-1247-01)
 - Agitador de placa (MixMate de Eppendorf)
 - Tampón de bicarbonato solución de Krebs-Ringer HEPES balanceado (componentes como sigue)

40

Componentes	Conc. de solución de reserva (mM)	peso mol.	cantidad requerida para preparar 50 ml de solución de reserva	(1X) Tampón HEPES KR (mM)	Volumen de la solución de reserva requerida para preparar la solución de trabajo (ml)	
					para 50 ml con 0.1%BSA	para 50 ml sin BSA
NaCl	5000	58.44	14.61	119	1.19	1.19
KCl	100	74.55	0.37	4.74	2.37	2.37
CaCl ₂	100	110.98	0.55	2.54	1.27	1.27
MgCl ₂	100	203.31	1.02	1.19	0.595	0.595
KH ₂ PO ₄	100	136.08	0.68	1.19	0.595	0.595
NaHCO ₃	200	84.01	0.84	25	6.25	6.25
HEPES	1000	1M solución de reserva	0.00	10	0.5	0.5
Agua destilada					37.23	37.23
BSA				0.10%	50 mg	Sin BSA

*HEPES es ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico).

Método

- i. Sembrar el cultivo proliferante de células MIN-6 en una placa de 6 pocillos con casi la mitad de la confluencia dos días antes del experimento.
- ii. El día del experimento de inducción de insulina, las células deberían volverse casi confluentes y están en buenas condiciones.
- iii. El día del experimento, preparar primero un tampón KRB-HEPES 1x con 0.1% de BSA (para enjuague) y sin BSA (para el equilibrio y la inducción de insulina) como se describe en los materiales.
- iv. Preparar el tampón de equilibrio: tampón KRB-HEPES 1x sin BSA que contiene 3.3 mM glucosa (para bajar el nivel de glucosa de todas las células al mismo nivel). Por ejemplo, añadir 66 µl de solución de reserva de glucosa 1 M a 20 ml de tampón KRB-HEPES sin BSA.
- v. Preparar el tampón de equilibrio (inducción de insulina): tampón KRB-HEPES 1x sin BSA que contiene el nivel de glucosa definida (en la mayoría de los casos, será 16.7 mM glucosa) y la concentración deseada de la molécula.
- vi. Precalentar todos los tampones a 37 ° C en el baño de agua (a los 15 minutos).
- vii. Retirar los medios de todos los pocillos, enjuagar cada pocillo dos veces con 2 ml de tampón KRB-HEPES que contenga 0.1% de BSA.
- viii. Añadir 2 ml de tampón de equilibrio en cada pocillo e incubar a 37 ° C durante media hora
- ix. Después de la incubación, añadir 2 ml de tampón estimulante en los pocillos respectivos (debidamente etiquetados) e incubar a 37 ° C durante 1 hora.
- x. Mientras tanto, encender la centrifuga refrigerada y ajustar la temperatura a 4 ° C. Retirar el conjugado enzimático, el tampón diluyente, el calibrador 0 y las tiras necesarias (por ejemplo, dos tiras para ejecutar 8 muestras por duplicado) de la caja del kit Mercodia ELISA (conservar a 4 ° C) y calentar a temperatura ambiente.
- xi. Después de terminar la incubación de 1 hora, sacar las placas de la incubadora, no alterar las células y tomar 1 ml de tampón estimulante en tubos enfriados previamente debidamente etiquetados.
- xii. Centrifugar los tubos a 600g por 5min.
- xiii. Tomar 500 ul en tubos enfriados previamente etiquetados adecuadamente.
- xiv. Ahora diluir las muestras 1:30 en el calibrador 0, es decir, añadir 3 ul de cada muestra a 87 ul de Calibrator 0 en 8 tubos diferentes de 0.5 ml debidamente etiquetados. Mezclarlos bien.
- xv. Preparar tampón conjugado de enzima 1x, es decir, mezclar 180 ul de enzima (11x) con 1800ul de tampón diluyente para ELISA de dos tiras.
- xvi. Añadir 10 ul de cada muestra (diluido, en duplicado) en los dos pocillos adyacentes. Tener cuidado de no tocar el fondo.
- xvii. Añadir cuidadosamente 100µl de tampón conjugado enzimático (1x) a cada pocillo e incubar en un agitador de placa (eppendorf MixMate) a 800 rpm durante 2 horas a 25 ° C.
- xviii. 45 minutos antes de que termine la incubación, sacar el tampón de lavado, el sustrato TMB y la solución de parada. Mantenerlos a temperatura ambiente.
- xix. 5 minutos antes de finalizar la incubación, preparar tampón de lavado 1x (21x), es decir, 40 ml de agua destilada + 2 ml (21 x) de tampón de lavado en un depósito.

xx. Después de que la incubación haya terminado, lavar cada pocillo 7 veces con 350 ul de tampón de lavado. Usar un multicanal (175ul).

xxi. Después del lavado, añadir 200uL de solución de sustrato TMB en cada pocillo. Mantener un ritmo adecuado.

5 xxii. Mantener en incubación por 15 min. Configurar el programa en el lector de placas, para tomar lecturas de absorbancia a 450 nm. Añadir una etapa de agitación de 5 segundos para permitir una mezcla adecuada.

xxiii. Después de la incubación, añadir inmediatamente 50 ul de solución de parada en cada pocillo al mismo ritmo y tomar la lectura de absorbancia a 450nm.

10 Las condiciones del ensayo se mantuvieron iguales en todos los ensayos. La diferencia en el valor de absorción para el experimento de control (sin tratamiento con la molécula) en diferentes días se atribuye a las condiciones de cultivo celular. Otras condiciones variables se especifican en los gráficos respectivos. Los resultados obtenidos se compilan a continuación.

[Nota: Si no se menciona específicamente, HG = Glucosa alta (16.7 mM), LG = Glucosa baja (3.3 mM)]

15 Resultados

NDS100178 y NDS100179 Mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa

20 La capacidad de secreción de insulina de NDS100178 y NDS100179 se midió en tres días diferentes como en la Figura 1. Como se representa más abajo, se observó un aumento significativo en la secreción de insulina a partir de células MIN6 en condiciones de glucosa alta cuando las células se trataron con NDS100178 o NDS100179, ambas a una concentración de 33 uM, durante 1 hora.

25 La actividad insulínica de NDS100178 y NDS100179 depende de la glucosa

La actividad insulínica de NDS100178 y NDS100179 se encontró que era dependiente de la glucosa. Como se representa más abajo, se observó un aumento significativo en la secreción de insulina sobre el control respectivo en el que las células estaban presentes en condiciones de glucosa alta en comparación con las condiciones de glucosa más baja como en la Figura 2.

NDS100178 y NDS100179 exhiben actividad insulínica a concentraciones bajas

35 Como se muestra más abajo, NDS100178 indujo un aumento de más del 100% en la secreción de insulina cuando se incubó a una concentración de 100 nM. No se obtuvo una diferencia significativa sobre los experimentos de control cuando la concentración se redujo a 50 nM o 10 nM.

Curiosamente, NDS100179 estaba activo incluso a concentraciones tan bajas como 10 nM Aunque el aumento en la secreción de insulina sobre el experimento de control en presencia de NDS100179 10 nM no fue estadísticamente significativo, la incubación con una concentración 50 nM y 100 nM de la molécula mostró claramente la tendencia de que la molécula era un insulínico activo.

Propiedades Insulínicas de los Compuestos

45 Secreción de insulina de las células MIN6 Tabla 1:

Compuesto	Concentración (uM)	Secreción de insulina (ng/ml)
NDS100178	10.0 / 1.0 / 0.1	35.09 (4.0) / 12.49 (1.9) / 8.91 (1.6)
NDS100179	10.0 / 1.0 / 0.1	15.45 (1.2) / 10.27 (0.6) / 5.55 (1.0)
NDS100277	10.0 / 1.0 / 0.1	20.96 (1.7) / 14.66 (0.4) / 11.87 (0.8)
NDS100278	10.0 / 1.0 / 0.1	13.16 (1.6) / 10.80 (0.2) / 12.43 (1.1)
NDS100279	10.0 / 1.0 / 0.1	21.45 (0.9) / 14.57 (3.0) / 10.45 (1.6)
NDS100281	10.0 / 1.0 / 0.1	20.85 (0.8) / 16.91 (0.1) / 14.73 (0.5)
NDS100282	10.0 / 1.0 / 0.1	33.15 (0.7) / 18.73 (1.0) /

Compuesto	Concentración (μM)	Secreción de insulina (ng/ml)
		13.02 (0.3)
NDS100283	10.0 / 1.0 / 0.1	50.45 (3.8) / 20.08 (0.8) / 11.35 (1.0)
Ejemplo-6 de la Patente US20040009976 Compuesto: 5-Cloro-2-metil-3-(4,5-dihidro-1-H-imidazol-2-il)-1H-indol	1.0 / 0.1	3.68 (2.11) / 1.39 (0.15)
Los valores en el paréntesis son un error estándar de las mediciones.		

Ejemplo 10:

5 Reducción de glucosa y secreción de insulina dependiente de glucosa en ratones de laboratorio no diabéticos por NDS100179

Reducción de glucosa en ratones C57BL/6J

10 Ratones macho C57BL/6J de 12-13 semanas ayunaron durante la noche. Por la mañana, los animales se dosificaron por vía oral con diferentes concentraciones de NDS 100179 o vehículo de control junto con 3 g/kg de glucosa. La glucosa en sangre se midió justo antes de la dosis y después de 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la dosis del compuesto. La molécula reduce de forma dependiente de la dosis la glucosa en sangre en ratones C57.B1/6J (Figura 4).

15 Aumento de insulina en ratones C57BL/6J

20 También se midió la insulina en puntos de tiempo de 0 y 15 minutos en los estudios realizados anteriormente donde ratones machos C57BL/6J de 12-13 semanas ayunaron durante la noche y por la mañana se dosificaron oralmente con diferentes concentraciones de NDS100179 o vehículo de control junto con 3g/kg de glucosa. Se encontró que la secreción de insulina a partir de NDS100179 era dependiente de la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo (Figura 5).

Ejemplo 11:

25 Mejora de la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) por NDS100179

30 NDS100179 son compuestos insulínotropicos que aumentan la secreción de insulina solamente a una concentración alta de glucosa. Las mediciones de insulina inducida por NDS 100179 a una condición alta y baja glucosa se llevaron a cabo en Islotes humanos, ratones y células MIN6. Los datos presentados muestran claramente que la capacidad de mejora de GSIS de NDS 100179 es similar en diferentes sistemas biológicos (Figura 5).

Ejemplo 12:

35 NDS100179 - Glucosa en plasma en ayunas y tolerancia a la glucosa en el modelo animal de diabetes (ratones db/db)

40 Los ratones db/db o nulos para leptina son modelos de diabetes bien aceptados. Los ratones db/db de 7 semanas se dosificaron por vía oral con 10 mg/kg, 30 mg/kg de NDS100179 y vehículo solo durante 30 días. Los niveles de glucosa en plasma en ayunas en los animales se midieron antes del inicio del estudio, el día 15 y el día 30. Los animales tratados con NDS 100179 mostraron un control significativo en el aumento del nivel de glucosa basal, un efecto que dependía de la cantidad de molécula que se les daba a los animales. Los animales tratados con 30 mg/kg de NDS100179 no mostraron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de glucosa en la sangre en ayunas. La prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) realizada al final de 30 días mostró una mejora significativa en la tolerancia a la glucosa en ratones tratados con NDS100179 (Figuras 6a y 6b).

Ejemplo 13:

50 NDS100179 - Conservación/restauración de la función de células beta en el modelo animal de diabetes (ratones db/db) Ratones db/db de 7 semanas se dosificaron por vía oral con 10 mg/kg, 30 mg/kg de NDS100179 y vehículo solo durante 30 días. La funcionalidad de las células beta se evaluó usando cálculos HOMA-beta % al final de los 30 días. Los ratones tratados con NDS100179 mostraron mejoras significativas en las funciones de las células beta (Figura 6c).

Ejemplo 14:

55 NDS100179 - Reducción de triglicéridos en el modelo animal de diabetes (ratones db/db)

Ratones db/db de 7 semanas se dosificaron por vía oral con 10 mg/kg, 30 mg/kg de NDS100179 y vehículo solo durante 30 días. Los niveles de triglicéridos se midieron al final de los 30 días. Los ratones tratados con NDS100179 mostraron una reducción significativa en los niveles de triglicéridos (Figura 7a).

5 Ejemplo 15:

NDS100179 - Sin alteración del peso corporal en el modelo animal de diabetes (ratones db/db)

10 Ratones db/db de 7 semanas se dosificaron por vía oral con 10 mg/kg, 30 mg/kg de NDS100179 y vehículo solo durante 30 días. El peso corporal de los animales se midió cada tres días. No se observó un cambio significativo en el peso corporal en ratones tratados con NDS100179 (Figura 7b).

Ejemplo 16:

15 Propiedades farmacocinéticas de NDS100179

En base a los estudios farmacocinéticos realizados en ratones, NDS100179 es un compuesto biodisponible por vía oral al 100% (Figura 9).

Mediciones	Valores
C _{máx} (ng/ml)	631.1
T _{máx} (h)	0.25
AUC(inf) (h*ng/ml)	854.231
AUC(0-t) (h*ng/ml)	837.113
AUC(inf)/AUC(0-t)%	102.049
t _{1/2} (h)	1.7

20

Ejemplo 17:

Propiedades ADME in Vitro

Compuesto	Solubilidad cinética media (μM)	Inhibición de CYP3A4	Estudio metabólico MLM Media % PCR*	Estudio metabólico HLM Media % PCR*	Límite intrínseco MLM (μl/min/mg de proteína)
NDS100178	214.20	No se observa inhibición	38.84	79.70	80.8
NDS100179	205.27	No se observa inhibición	39.25	80.11	63.7
NDS100282	201.60	IC ₅₀ > 10 μM	33.27	71.71	56.4
NDS100283	113.39	No se observa inhibición	19.09	86.02	145.5
Ejemplo-6 de la Patente US2004000997 6 Compuesto: 5-Cloro-2-metil-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indol	196.50	No se observa inhibición	64.83	99.1	21.3

25

Ejemplo 18:

NDS100179 - Aumento en la captación de glucosa en células HepG2

30 NDS100179 aumenta la captación de glucosa en células HepG2 (Figura 8). El ensayo se realizó después de hacer las células HepG2 resistentes a la insulina cultivándolas en condiciones de alta glucosa con los fármacos respectivos durante 24 horas. El ensayo se realizó después de 24 horas dejando que las células murieran durante 2 horas en medio

libre de suero (que contenía el fármaco respectivo) seguido de 30 min de incubación en tampón KRB (con los fármacos respectivos) y finalmente incubando con 2-NBDG (análogo de la glucosa fluorescente) por 15 min. Las células se lavaron a fondo y se lisaron con 1% de tritón-X. La lectura de fluorescencia se tomó inmediatamente en Ex:465 y Em:540.

5

Ejemplo 19:

Mecanismo de Acción

10 La serie de compuestos NDS100178 activa principalmente el receptor de imidazolina II/13 (IC₅₀ - 50 nM). En condiciones de glucosa alta, esta activación conduce a la formación de Diacilglicerol (DAG). DAG genera posteriormente Ácidos Araquidónicos (AA) en la célula. Los metabolitos de AA especialmente los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) y los ácidos hidroxieicosatetrenoicos (HETE) inducen exocitosis que conduce a una mayor secreción de insulina de las células. La otra vía de señalización principal que puede alterar el conjunto de AA inducido por glucosa/DAG es la vía de los leucotrienos, que, al metabolizar AA en diferentes leucotrienos y no en EET y HETE puede suprimir su efecto de secreción de insulina. Las moléculas que pueden inhibir el metabolismo de AA a través de la vía de los leucotrienos pueden mantener un conjunto de AA que conduce a su metabolismo solo a través de EET y HETE y, por lo tanto, pueden potenciar el aumento de la secreción de insulina. Una de las principales enzimas en la ruta de los leucotrienos es la LTA4H hidrolasa que convierte LTA4 en LTB₄, un derivado de AA que suprime la secreción de insulina. Un nuevo descubrimiento de que la inhibición de LTA4H puede potenciar la secreción de insulina ha sido establecido por los inventores. NDS100178 inhibe LTA4H (IC₅₀ < 500 nM) mientras que la IC₅₀ contra el LTA4H objetivo del compuesto 6 de la patente US20040009976 Compuesto: 5-Cloro-2-metil-3-(4,5-dihidro-1-H-imidazol-2-il)-1H-indol) está por encima de 10 uM.

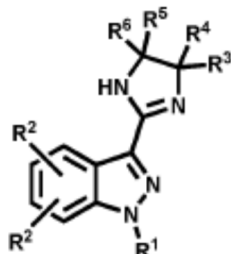
25 Ventajas de la invención

- > Nuevos compuestos antidiabéticos.
- > Secreción controlada de insulina con respecto al nivel de glucosa en el ambiente circundante.
- > Mejora los efectos secundarios de otros medicamentos antidiabéticos, como la hipoglucemia.
- 30 > Proporciona protección cardiovascular al disminuir los triglicéridos
- > Mejora / preserva la funcionalidad de las células beta
- > Eficaz contra la diabetes tipo 1 y tipo 2 y las complicaciones relacionadas.
- > Proceso de preparación económica y comercialmente factible.

35

Reivindicaciones

1. Compuestos de indazol de la Fórmula 1,



Fórmula 1

En donde:

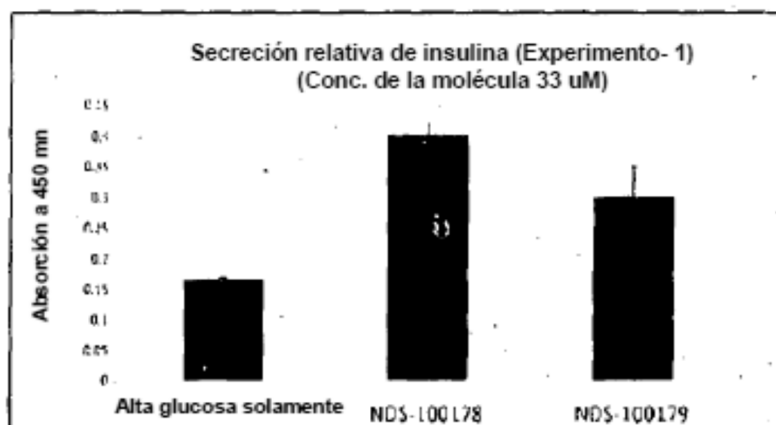
R¹ son hidrógeno o alquilo o arilo o heteroarilo;

R² son H o halógeno

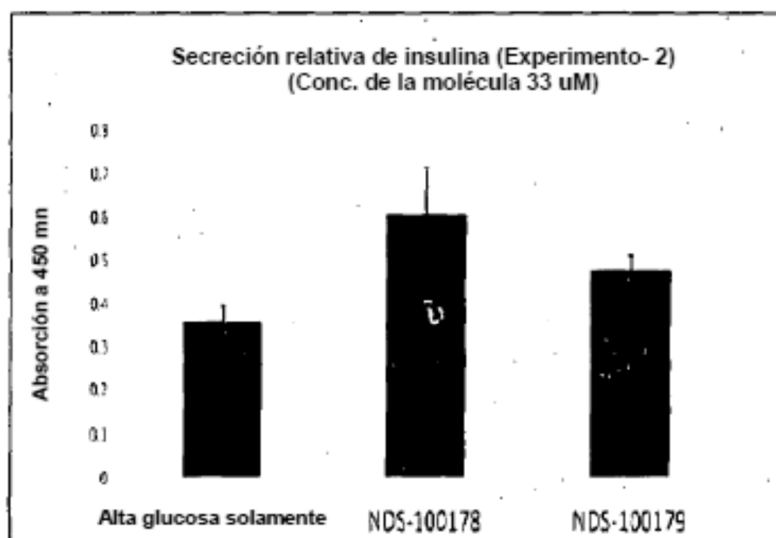
R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente hidrógeno o alquilo, arilo, heteroarilo;

dos grupos adyacentes seleccionados de R³, R⁴, R⁵, y R⁶ puede formar un ciclo de 3-8 miembros que además puede contener heteroátomos; y sus estereoisómeros y sal farmacéuticamente aceptable de estos.

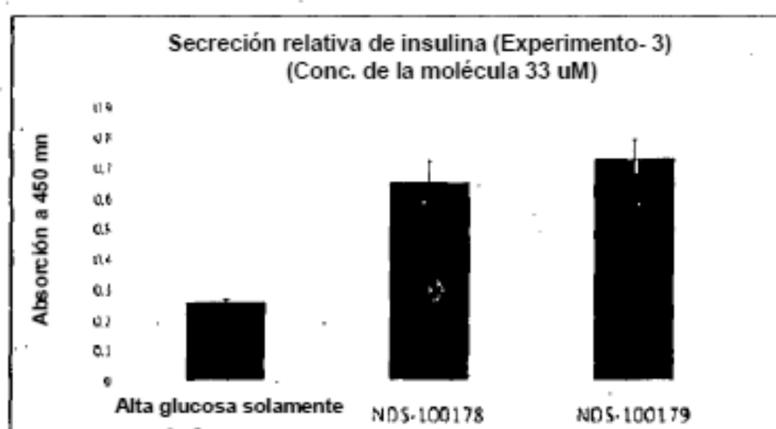
2. Los compuestos de indazol de la Fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 1 se representan por los siguientes compuestos
- 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 - 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-3a,7a-dihidro-1H-indazol;
 - 5-Cloro-3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol ;
 - 5-Cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-etil-1H-indazol;
 - 1-Bencil-5-cloro-3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 - 3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-indazol;
 - 3-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1-metil-1H-indazol;
 - 3-(3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-indazol.
3. Un proceso para la preparación de compuestos de indazol de la Fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho proceso comprende las etapas de;
- i. convertir 5-cloro isatina (1) en ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2);
 - ii. tratar el compuesto ácido 5-cloro indazol 3-carboxílico (2) con cloroformiato de isobutilo y N-metilmorfolina bajo argón seguido por la reacción con amoníaco ac. para obtener 5-cloro-1H-indazol-3-carboxamida (3);
 - iii. tratar el compuesto 5-cloro-1H-indazol-3-carboxamida (3) con piridina y anhídrido trifluoroacético para obtener el compuesto ciano (4);
 - iv. reaccionar el compuesto ciano (4) con carbonato de potasio y haluro de alquilo en un solvente seleccionado de acetona para obtener indazol carbonitrilo sustituido;
 - v. reaccionar el indazol carbonitrilo sustituido con diamina en presencia de P₂S₅ para obtener los compuestos de la Fórmula general 1
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el haluro de alquilo usado en la etapa (iv) se selecciona del grupo que consiste en bromuro de etilo, yoduro de metilo, bromuro de bencilo.
5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la diamina usada en la etapa (v) se selecciona del grupo que consiste en 1,2-ciclohexanodiamina, etilendiamina.
6. Una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la Fórmula 1 como se reivindica en la reivindicación 1 como un ingrediente activo, o sus estereoisómeros, y sal farmacéuticamente aceptable de estos, junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. Compuestos de indazol de la Fórmula 1 como se reivindica en la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de la diabetes, complicaciones diabéticas, trastornos metabólicos, disfunciones cardiovasculares o enfermedades relacionadas donde la reducción de la glucosa deteriorada, alteración de los niveles de triglicéridos o reducción de las funciones de las células beta está presente.
8. Compuestos de indazol de la Fórmula 1 como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dichos compuestos son para administración a un mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula 1, o sus estereoisómeros, y sal farmacéuticamente aceptable de estos.



a

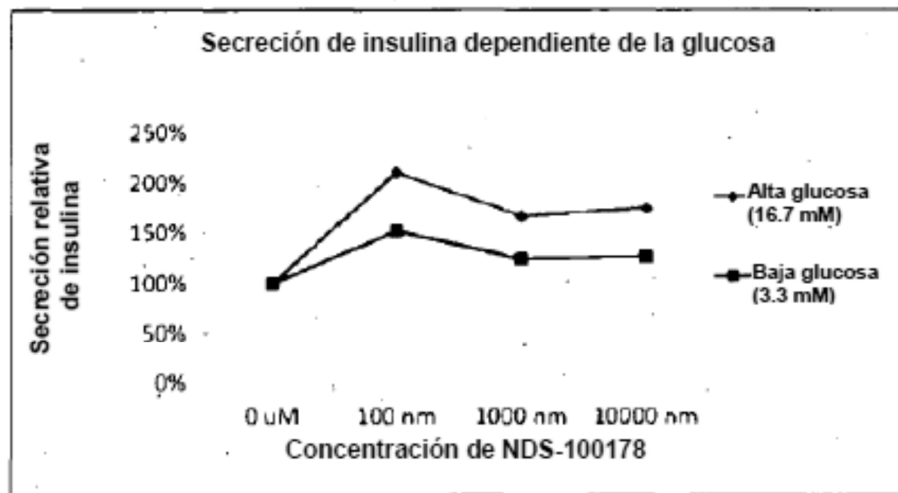


b

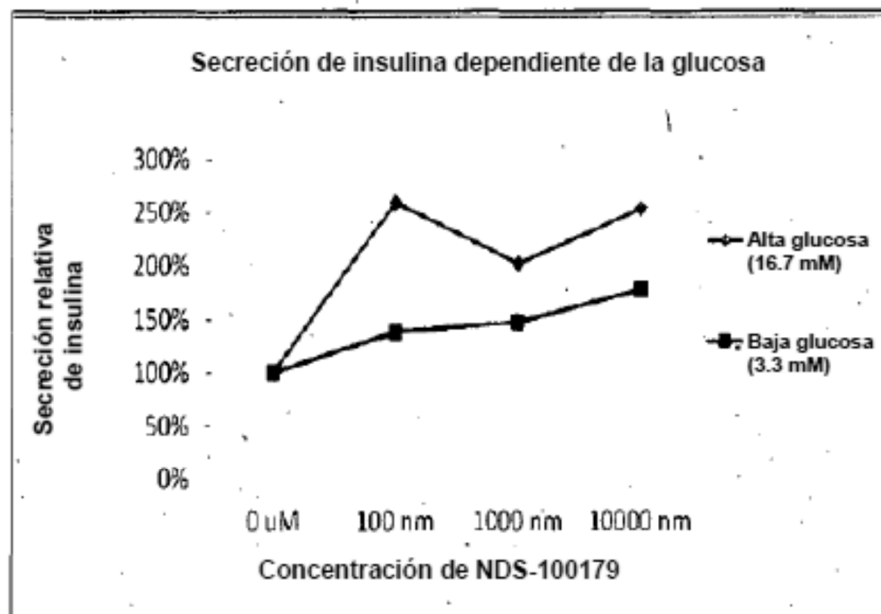


c

Figura 1

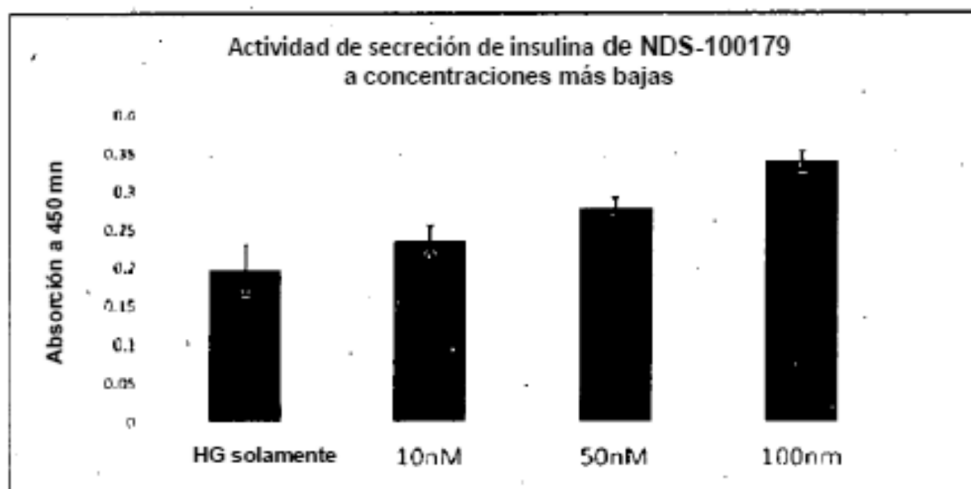


A

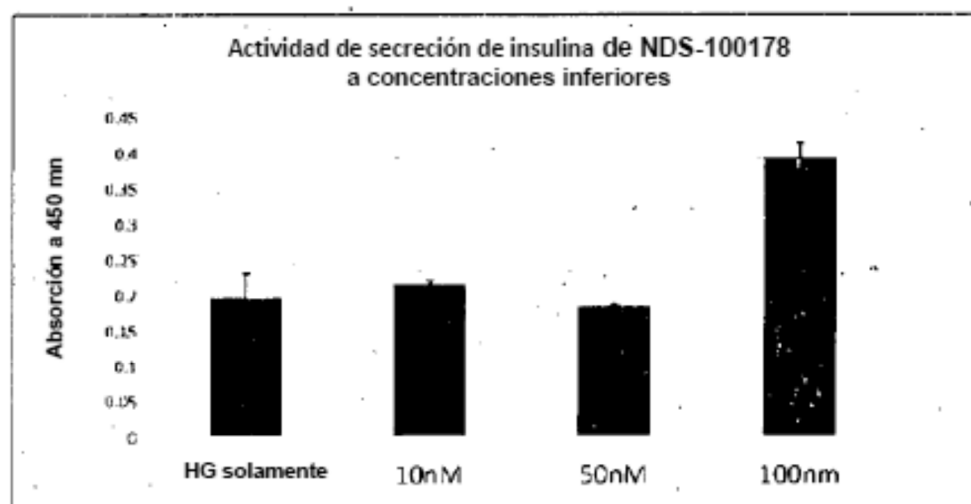


b

Figura 2



a



b

Figura 3

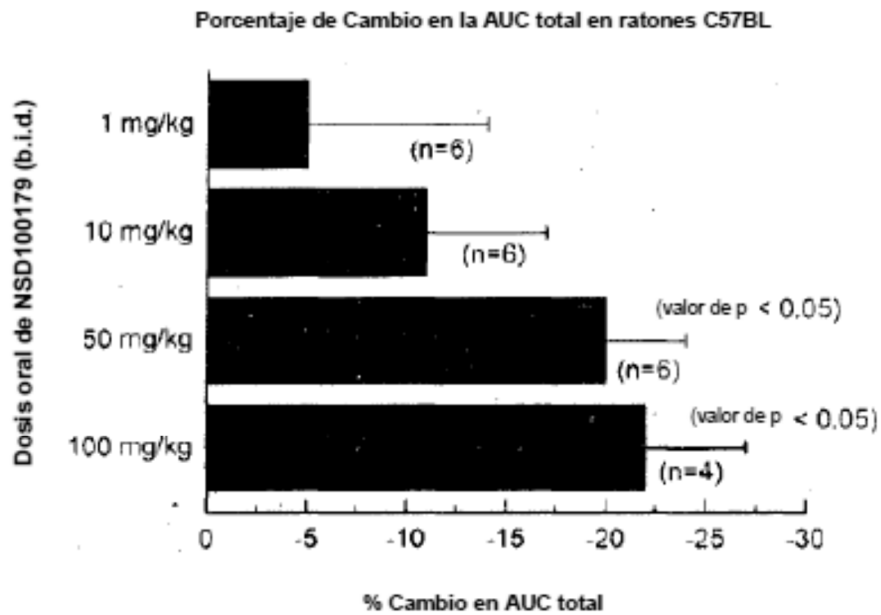
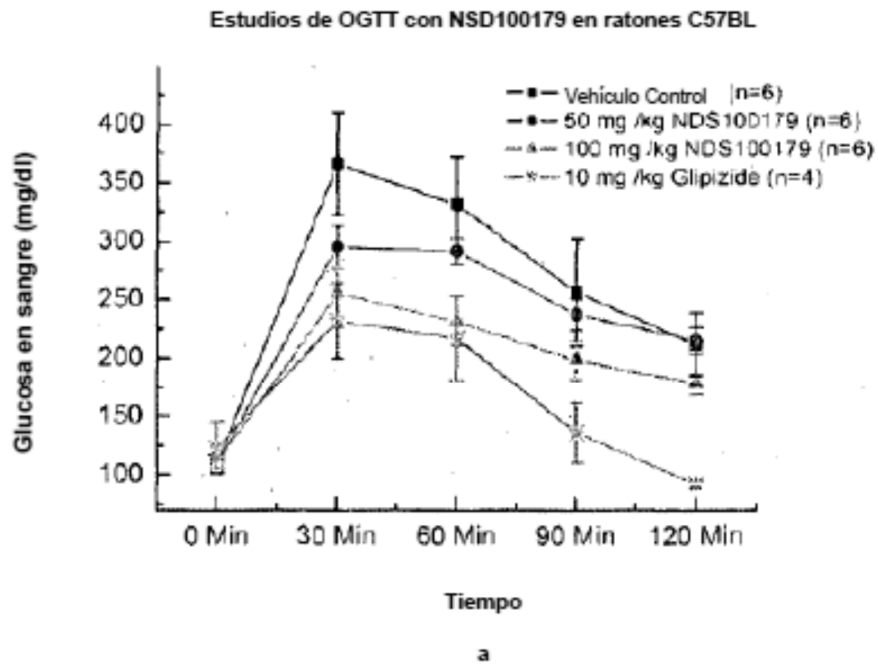


Figura 4

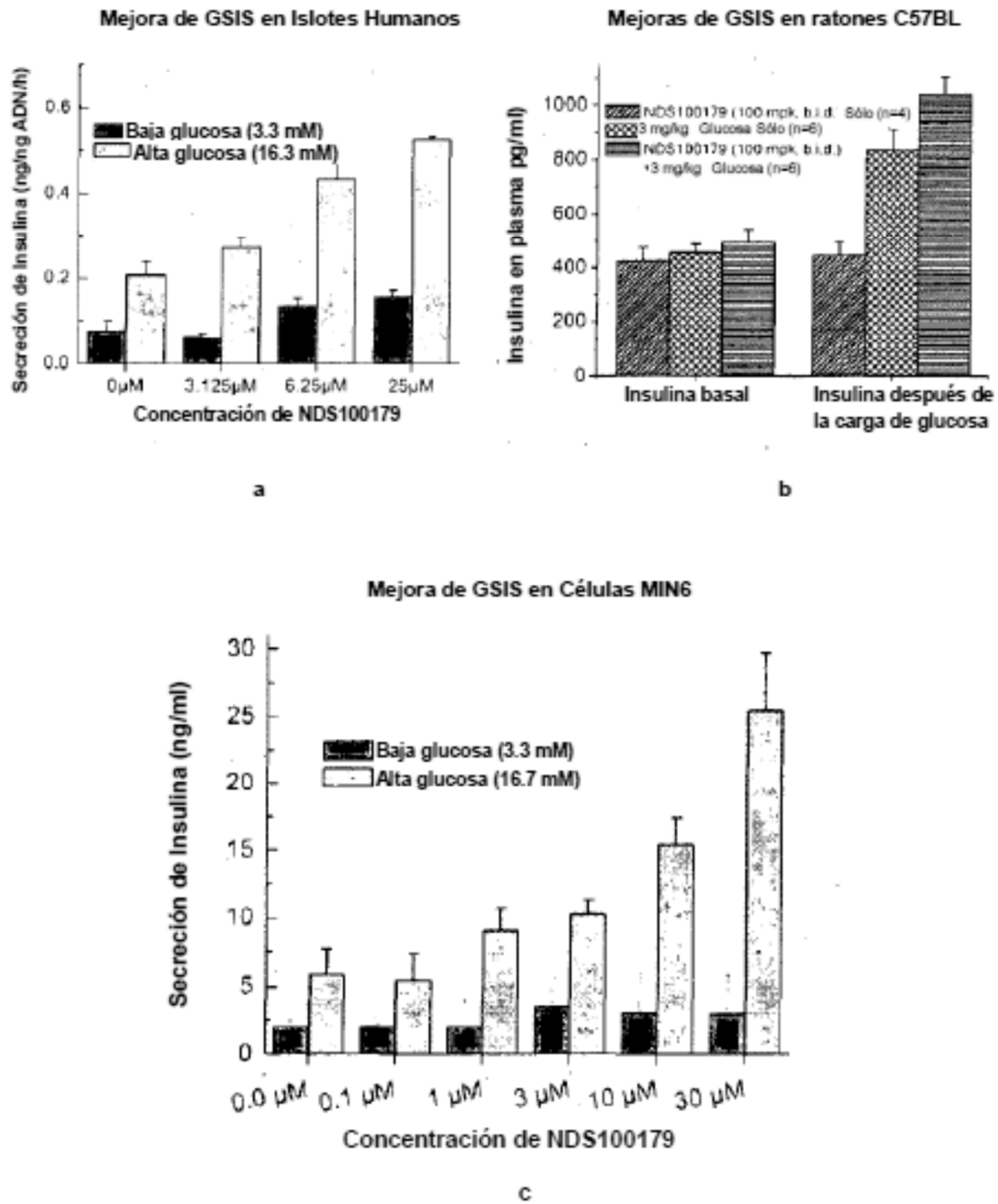
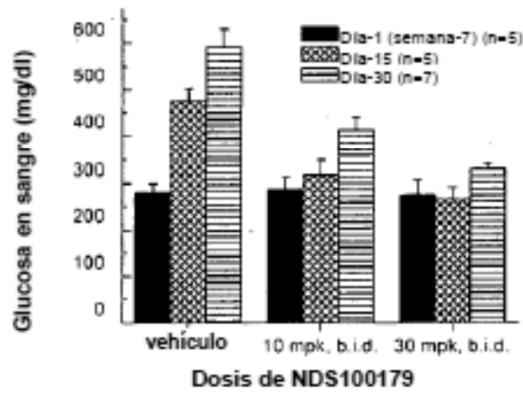


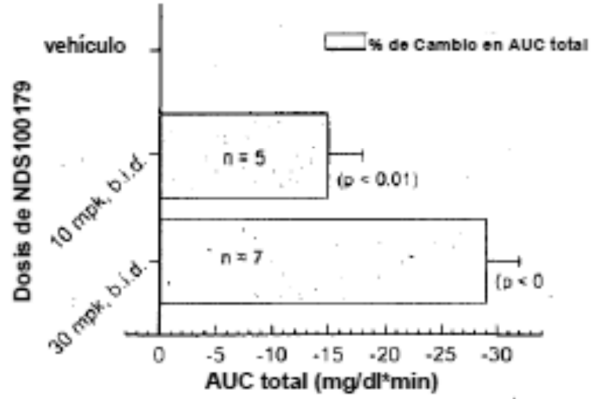
Figura 5

Manejo del a glucosa en ratones db/db por NDS100179

OGTT en ratones db/db de 12 semanas

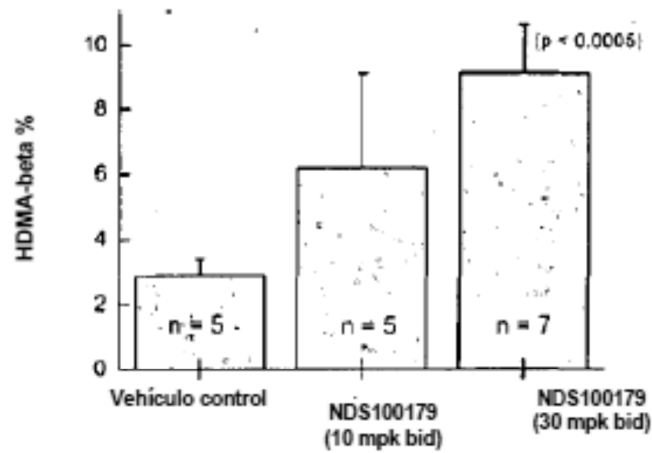


a



b

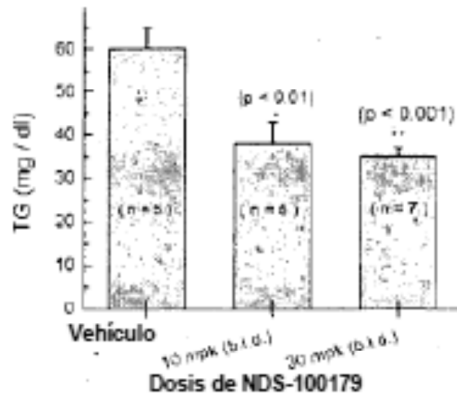
Protección de células Beta
30 días de tratamiento con NDS100179



c

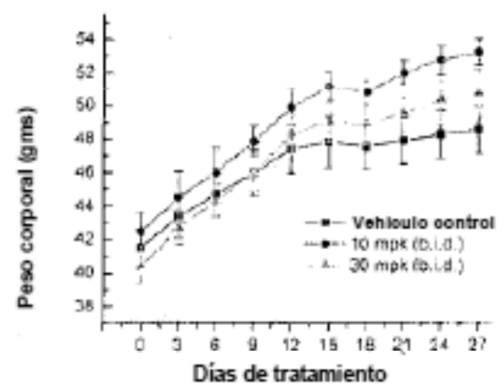
Figura 6

Reducción en TG por NDS-100179 en ratones db/db



a

Control del peso corporal por NDS-100179 en ratones db/db



b

Figura 7

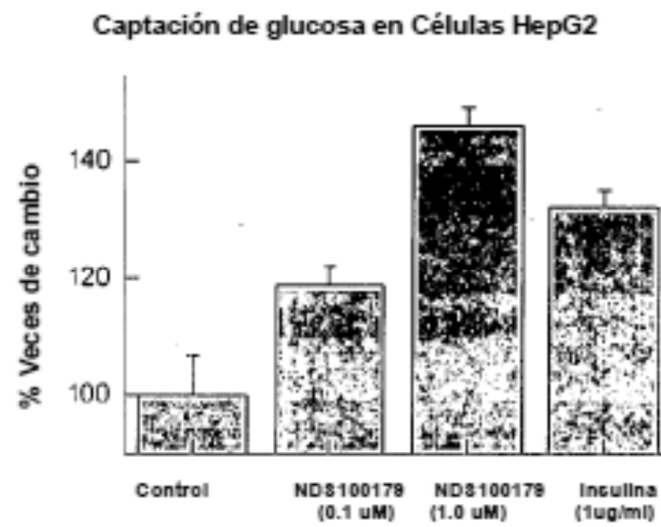


Figura 8

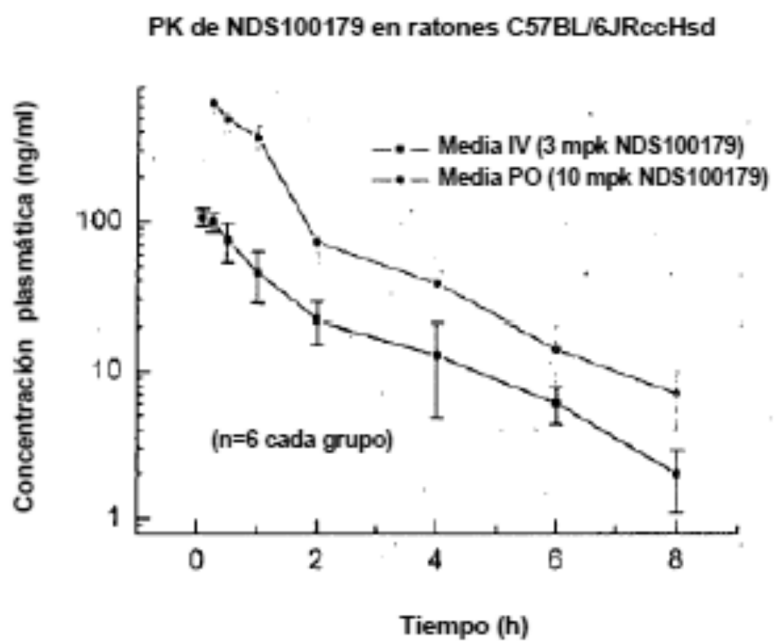


Figura 9

Comparación del Compuesto-6 (Patente US 2004/000997)
Con NDS100179 en OGTT en ratones C57BL

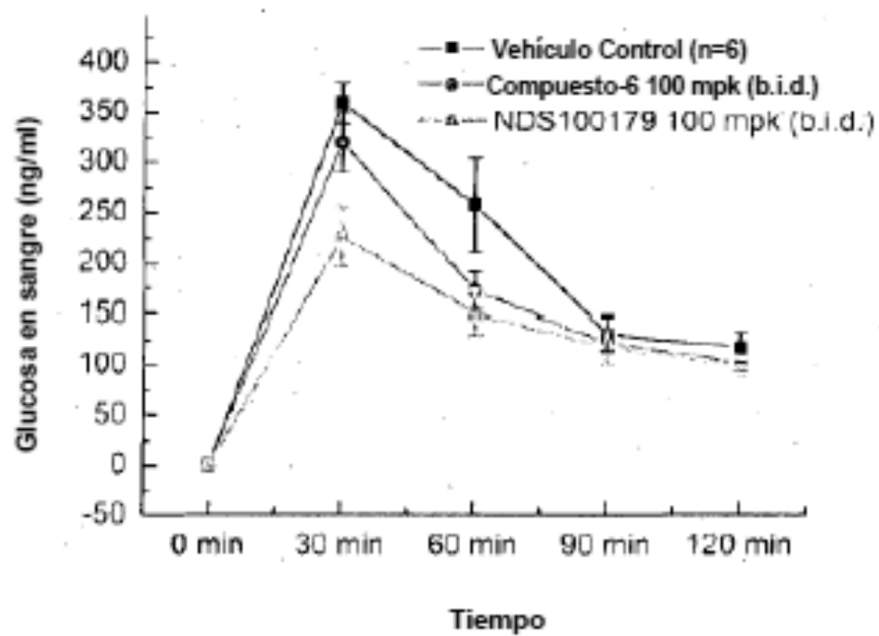


Figura 10