

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 648**

51 Int. Cl.:

**C07D 417/14** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 403/14** (2006.01)  
**C07D 413/14** (2006.01)  
**C07D 405/14** (2006.01)  
**A61K 31/44** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2006 E 06755703 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1902052**

54 Título: **Derivados de heteroarilbenzamida para uso como activadores de GLK en el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

**09.07.2005 GB 0514173**  
**09.08.2005 GB 0516297**  
**24.11.2005 GB 0523862**  
**02.12.2005 GB 0524589**  
**22.04.2006 GB 0607977**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2013**

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)**  
**ALDERLEY PARK**  
**MACCLESFIELD CHESHIRE SK10 4TG, GB**

72 Inventor/es:

**MCKERRECHER, DARREN;**  
**PIKE, KURT, GORDON y**  
**WARING, MICHAEL JAMES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 397 648 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

Derivados de heteroarilbenzamida para uso como activadores de GLK en el tratamiento de la diabetes.

La presente invención se refiere a un grupo de compuestos de benzoil-amino-heterociclilo que son útiles en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por glucocinasa (GLK o GK, por sus siglas en inglés), que conduce a un umbral de glucosa disminuido para la secreción de insulina. Además, se prevé que los compuestos disminuyan la glucosa en sangre al aumentar la absorción de glucosa hepática. Dichos compuestos pueden tener utilidad en el tratamiento de la diabetes Tipo 2 y la obesidad. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y al uso de dichos compuestos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por GLK.

En las células  $\beta$  pancreáticas y células parenquimales del hígado, el principal transporte de glucosa en la membrana plasmática es GLUT2. A concentraciones fisiológicas de glucosa, la velocidad con la que GLUT2 transporta glucosa a través de la membrana no limita la velocidad total de absorción de glucosa en estas células. La velocidad de absorción de glucosa está limitada por la velocidad de fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P, por sus siglas en inglés) que está catalizada por la glucocinasa (GLK) [1]. La GLK presenta una alta  $K_m$  (6-10 mM) para la glucosa y no resulta inhibida por concentraciones fisiológicas de G-6-P [1]. La expresión de GLK está limitada a unos pocos tejidos y tipos de células, y de forma especialmente notable a células  $\beta$  pancreáticas y células hepáticas (hepatocitos) [1]. En estas células, la actividad de la GLK limita la velocidad de utilización de glucosa y, por lo tanto, regula el grado de secreción de insulina inducida por la glucosa y la síntesis de glucógeno hepático. Estos procesos son críticos para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa total del cuerpo y ambos son disfuncionales en la diabetes [2].

En un subtipo de diabetes, la Diabetes Tipo 2 del Adulto de Inicio Juvenil (MODY-2, por sus siglas en inglés), la diabetes está provocada por mutaciones que determinan la pérdida de función de GLK [3, 4]. La hiperglucemia en pacientes con MODY-2 resulta de la utilización defectuosa de la glucosa tanto en el páncreas como en el hígado [5]. La utilización defectuosa de la glucosa en el páncreas de pacientes con MODY-2 da como resultado un umbral elevado para la secreción de insulina estimulada por la glucosa. Por el contrario, raras mutaciones activadoras de GLK reducen este umbral, dando como resultado hiperinsulinismo familiar [6, 6a, 7]. Además de la actividad reducida de GLK observada en diabéticos con MODY-2, la actividad de glucocinasa hepática también disminuye en pacientes con diabetes tipo 2 [8]. De manera importante, la sobreexpresión selectiva global o hepática de GLK evita o invierte el desarrollo del fenotipo diabético en modelos tanto dietéticos como genéticos de la enfermedad [9-12]. Además, el tratamiento agudo de diabéticos tipo 2 con fructosa mejora la tolerancia a la glucosa mediante la estimulación de la utilización de la glucosa hepática [13]. Se cree que este efecto está mediado por un aumento inducido por la fructosa de la actividad citosólica de la GLK en el hepatocito mediante el mecanismo que se describe más adelante [13].

La actividad de la GLK hepática se inhibe mediante la asociación con proteína reguladora de GLK (GLKRP). El complejo GLK/GLKRP se estabiliza enlazando fructosa-6-fosfato (F6P) con la GLKRP, y se desestabiliza por desplazamiento de este azúcar fosfato mediante fructosa-1-fosfato (F1P). La F1P se genera por fosforilación de la fructosa dietética mediada por fructocinasa. Por consiguiente, la integridad del complejo GLK/GLKRP y la actividad de la GLK hepática se regulan de manera nutricional dependiente, ya que la F6P predomina en el estado post-absortivo mientras la F1P predomina en el estado post-prandial. En contraste con el hepatocito, la célula  $\beta$  pancreática expresa la GLK en ausencia de GLKRP. Por lo tanto, la actividad de GLK en células  $\beta$  se regula en gran medida por la disponibilidad de su sustrato, es decir, la glucosa. Pequeñas moléculas pueden activar la GLK ya sea directamente o por desestabilización del complejo GLK/GLKRP. Se prevé que la primera clase de compuestos estimule la utilización de glucosa tanto en el hígado como en el páncreas, mientras que se prevé que los últimos actúen selectivamente en el hígado. Sin embargo, se prevé que los compuestos con cualquiera de estos perfiles produzcan beneficio terapéutico en el tratamiento de la diabetes Tipo 2, ya que esta enfermedad se caracteriza por la utilización defectuosa de la glucosa en ambos tejidos.

La GLK y la GLKRP y el canal  $K_{ATP}$  se expresan en neuronas del hipotálamo, una región del cerebro que es importante en la regulación del equilibrio de energía y el control de la ingesta de alimentos [14-18]. Se ha demostrado que estas neuronas expresan neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos [15, 19, 20] y se supone que son neuronas sensoras de la glucosa dentro del hipotálamo, que resultan inhibidas o excitadas por variaciones de las concentraciones ambientales de glucosa [17, 19, 21, 22]. La capacidad de estas neuronas para percibir cambios en los niveles de glucosa es defectuosa en una variedad de modelos de obesidad inducidos genética y experimentalmente [23-28]. La infusión intracerebroventricular (icv) de análogos de glucosa, que son inhibidores competitivos de la glucocinasa, estimula la ingesta de alimentos en ratas delgadas [29, 30]. Por el contrario, la infusión icv de glucosa suprime la toma de alimentos [31]. De esta forma, pequeñas moléculas activadoras de GLK pueden disminuir la ingesta de alimentos y la ganancia de peso a través de efectos centrales sobre la GLK. Por lo tanto, los activadores de GLK pueden ser de uso terapéutico en el tratamiento de trastornos de la alimentación, incluida la obesidad, además de la diabetes. Los efectos hipotalámicos serán aditivos o sinérgicos con respecto a los efectos de los mismos compuestos que actúan en el hígado y/o páncreas en la normalización de la homeostasis de la glucosa, para el tratamiento de la diabetes Tipo 2. De este modo, el sistema GLK/GLKRP puede describirse como un objetivo potencial de "Diabesidad" (de beneficio tanto en la Diabetes como en la Obesidad).

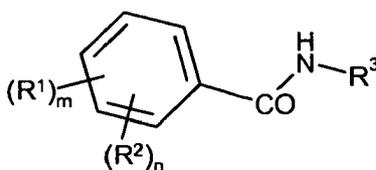
La GLK también se expresa en células entero-endocrinas específicas donde se cree que controla la secreción sensible a la glucosa de los péptidos de incretina GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) y GLP-1 (Péptido Similar al Glucagón Tipo 1) de células K y células-L del intestino, respectivamente (32, 33, 34). Por lo tanto, pequeñas moléculas activadoras de GLK pueden presentar efectos beneficiosos adicionales sobre la secreción de insulina, la función y supervivencia de las células  $\beta$  y el peso corporal como consecuencia de la estimulación de la secreción de GIP y GLP-1 de estas células entero-endocrinas.

En las patentes internacionales WO 00/58293 y WO 01/44216 (Roche), se describe una serie de compuestos de bencilcarbamoilo como activadores de la glucocinasa. El mecanismo por el que dichos compuestos activan la GLK se evalúa midiendo el efecto directo de dichos compuestos en un ensayo en el que la actividad de la GLK está unida a la producción de NADH, que se mide a su vez de forma óptica - véase más adelante la descripción de los detalles del ensayo *in vitro*. Los compuestos de la presente invención pueden activar la GLK de manera directa o pueden activar la GLK inhibiendo la interacción de GLKRP con GLK.

Adicionalmente, se han descrito activadores de la GLK en las solicitudes de patente internacional WO 03/095438 (fenilacetamidas sustituidas, Roche), WO 03/055482 (derivados de carboxamida y sulfonamida, Novo Nordisk), WO 2004/002481 (derivados de arilcarbonilo, Novo Nordisk), y en el documento WO 03/080585 (benzoil-amino-heterociclos aminosustituidos, Banyu).

La solicitud de patente Internacional número WO 03/000267 de los presentes inventores describe un grupo de ácidos benzoil-amino-piridil-carboxílicos que son activadores de la enzima glucocinasa (GLK).

La solicitud de patente Internacional número WO 03/015774 de los presentes inventores describe compuestos de la Fórmula (A):



(A)

en los que  $\text{R}^3$  es un heterociclo sustituido diferente de un piridilo sustituido con ácido carboxílico.

La solicitud de patente internacional WO 2004/076420 (Banyu) describe compuestos que son generalmente un subconjunto de los descritos en el documento WO 03/015774, en donde, por ejemplo,  $\text{R}^1$  es un alquil éter (sustituido) y  $\text{R}^2$  es fenoxi (sustituido).

Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente un pequeño grupo de compuestos, en general un subgrupo seleccionado de los descritos en el documento WO 03/015774, que tienen generalmente una potencia superior para la enzima GLK, y propiedades físicas más ventajosas, incluida, por ejemplo, mayor solubilidad acuosa, mayor permeabilidad y/o menor unión con proteínas del plasma. Por consiguiente, cabría esperar que esos compuestos que tienen un equilibrio de estas propiedades mostraran mayores niveles de fármaco libre en plasma y una eficacia *in vivo* mayor después de la dosis oral, como se determina, por ejemplo, por la actividad en las Pruebas de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG). Por lo tanto, cabría esperar que este grupo de compuestos proporcionara una mayor exposición oral a una dosis menor y, de este modo, serían particularmente adecuados para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por GLK. Los compuestos de la invención también pueden tener una potencia mayor y/o propiedades físicas ventajosas (como se ha descrito anteriormente) y/o perfiles de toxicidad favorables y/o perfiles metabólicos favorables en comparación con otros activadores de GLK conocidos en la técnica, así como con los descritos en el documento WO 03/015774.

De esta forma, según un primer aspecto de la invención se proporciona 3-[[5-(azetidín-1-il-carbonil)pirazin-2-il]-oxi]-5-[[(1S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)-benzamida o una sal de la misma.

El compuesto de la invención puede formar sales que están dentro del alcance de la invención. Se prefieren sales farmacéuticamente aceptables, aunque otras sales pueden ser de utilidad, por ejemplo, en el aislamiento o la purificación de compuestos.

En otro aspecto, la invención se refiere al compuesto de la invención o a una sal farmacéuticamente aceptable.

En esta memoria descriptiva, el término genérico "alquilo" incluye grupos alquilo de cadena tanto lineal como ramificada. Sin embargo, las referencias a grupos alquilo individuales tales como "propilo" son específicas solamente para la versión de cadena lineal, y las referencias a grupos alquilo de cadena ramificada tales como *t*-butilo son específicas solamente para la versión de cadena ramificada. Por ejemplo, "alquilo-(C1-4)" incluye: metilo, etilo, propilo, isopropilo y *t*-butilo. Un acuerdo similar es aplicable a otros términos genéricos.

También se entiende que el compuesto de la invención y sus sales pueden existir en formas solvatadas así como no solvatadas tales como, por ejemplo, formas hidratadas. Debe entenderse que la invención engloba todas dichas formas solvatadas que activan la GLK.

5 Una característica adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento

10 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GLK, en particular diabetes tipo 2.

Adicionalmente, según la invención, se proporciona el uso de un compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GLK, en particular diabetes tipo 2.

15 El compuesto se formula convenientemente como una composición farmacéutica para usar de esta forma.

Las enfermedades específicas que pueden tratarse mediante un compuesto o composición de la invención incluyen: disminución de la glucosa en sangre en la Diabetes Mellitus de Tipo 2 sin un riesgo importante de hipoglucemia (y potencial para tratar el tipo 1), dislipidemia, obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico X, tolerancia alterada a la glucosa.

20 Como se ha establecido anteriormente, el sistema GLK/GLKRP puede describirse entonces como un objetivo potencial de "Diabesidad" (de beneficio tanto en la Diabetes como en la Obesidad). De este modo, según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento combinado o en la prevención, en particular, en el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

25 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento o en la prevención, en particular, en el tratamiento de la obesidad.

30 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha definido anteriormente, como medicamento para el tratamiento o la prevención, en particular, el tratamiento de la obesidad.

El compuesto de la invención puede ser particularmente adecuado para ser usado como producto farmacéutico debido a sus ventajosas propiedades físicas y/o farmacocinéticas, y/o a su favorable perfil de toxicidad y/o a su favorable perfil metabólico.

35 El favorable perfil de toxicidad se puede demostrar, por ejemplo, usando un ensayo de Ames, y/o llevando a cabo un ensayo frente al canal iónico de hERG. La existencia de un perfil metabólico favorable puede significar, por ejemplo, una velocidad metabólica reducida que conduce a una reducción del aclaramiento del compuesto desde el organismo y, por lo tanto, una exposición aumentada al compuesto, o un perfil metabólico favorable puede significar, por ejemplo, la ausencia de formación de metabolitos (que, en determinadas circunstancias, podrían ser considerados indeseables).

40 Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para el uso oral (por ejemplo, como comprimidos, pastillas, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones, polvos o gránulos dispersables, jarabes o elixires), para el uso tópico (por ejemplo, como cremas, pomadas, geles o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas), para la administración por inhalación (por ejemplo, como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para la administración por insuflación (por ejemplo, como un polvo finamente dividido),  
45 o para la administración parenteral (por ejemplo, como una solución estéril, acuosa u oleosa para la administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular, o como supositorio para administración rectal). Se prefieren las formas farmacéuticas adecuadas para uso oral.

Las composiciones de la invención pueden obtenerse por procedimientos convencionales utilizando excipientes farmacéuticos convencionales, bien conocidos en la técnica. De esta forma, las composiciones destinadas a uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o múltiples agentes colorantes, edulcorantes, aromatizantes y/o conservantes.

50 Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para una formulación en comprimidos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes de granulación y disgregantes tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes tales como almidón; agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes conservantes tales como p-

hidroxibenzoato de etilo o propilo y antioxidantes, tales como ácido ascórbico. Las formulaciones en comprimidos pueden estar no recubiertas o recubiertas, ya sea para modificar su disgregación y subsiguiente absorción del principio activo en el tracto gastrointestinal, o para mejorar su estabilidad y/o aspecto, y se utilizan en cualquier caso agentes de recubrimiento y procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica.

- 5 Las composiciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en que las que el principio activo se mezcla con un diluyente inerte sólido, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o con un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- 10 Las suspensiones acuosas contienen en general el principio activo en forma de polvo finamente dividido, junto con uno o múltiples agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes de dispersión o agentes humectantes tales como lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos (por ejemplo estearato de polioxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales procedentes de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales procedentes de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales procedentes de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietileno-sorbitan. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o múltiples conservantes (tales como *p*-hidroxibenzoato de etilo o propilo), antioxidantes (tales como ácido ascórbico), agentes colorantes, agentes aromatizantes y/o agentes edulcorantes (tales como sacarosa, sacarina o aspartamo).
- 15
- 20

- 25 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal (tales como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida). Las suspensiones oleosas también pueden contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Se pueden agregar agentes edulcorantes tales como los indicados anteriormente y agentes aromatizantes, para proporcionar una preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

- 30 Los polvos y gránulos dispersables, adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua, contienen en general el principio activo junto con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o múltiples conservantes. Ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión apropiados son los que se han mencionado anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales tales como agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

- 35 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete o un aceite mineral, tal como por ejemplo parafina líquida o una mezcla de cualquiera de éstos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser, por ejemplo, gomas de origen natural tales como goma arábiga o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural tales como soja, lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (por ejemplo monooleato de sorbitán), y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno tales como monooleato de polioxietileno-sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, aromatizantes y conservantes.
- 40

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartamo o sacarosa, y también pueden contener un agente emoliente, conservante, aromatizante y/o colorante.

- 45 Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de suspensión inyectable estéril, acuosa u oleosa, que se puede formular de acuerdo con procedimientos conocidos, usando uno o múltiples agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión apropiados, que se han mencionado anteriormente. Una preparación inyectable, estéril, también puede ser una solución o suspensión inyectable, estéril, en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral, no tóxico, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol.

- 50 Las composiciones para administración por inhalación pueden estar en forma de aerosol presurizado convencional, dispuesto para dispensar el principio activo en forma de un aerosol que contiene gotitas sólidas o líquidas finamente divididas. Se pueden usar propelentes de aerosol convencionales tales como hidrocarburos volátiles, fluorados o no, y el dispositivo para el aerosol se dispone convenientemente para dispensar una cantidad medida de principio activo.

- 55 Para más información sobre formulación se remite al lector al Capítulo 25.2 en el Volumen 5 de *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Presidente del Comité Editorial), Pergamon Press 1990.

La cantidad de principio activo que se combina con uno o múltiples excipientes para producir una forma de dosificación única variará necesariamente en función del hospedador tratado y de la vía de administración particular. Por ejemplo, una formulación destinada a administración oral a seres humanos contendrá en general, por ejemplo,

de 0,5 mg a 2 g de agente activo mezclado con una cantidad apropiada y conveniente de excipientes, que puede variar desde aproximadamente 5 a aproximadamente 98 por ciento en peso de la composición total. Las formas de dosificación unitarias contendrán en general aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo. Para más información sobre Vías de Administración y Regímenes de Dosificación se remite al lector al Capítulo 25.3 en el Volumen 5 de *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Presidente del Comité Editorial), Pergamon Press 1990.

El tamaño de la dosis de un compuesto de la invención para fines terapéuticos o profilácticos variará lógicamente según la naturaleza y la gravedad de las afecciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la vía de administración, de acuerdo con principios bien conocidos de medicina.

En el uso con fines terapéuticos o profilácticos, el compuesto de la invención se administrará en general de manera que se reciba una dosis diaria en el intervalo de, por ejemplo, 0,5 mg a 75 mg por kg de peso corporal, administrada si es necesario en dosis divididas. En general, se administrarán dosis más bajas cuando se emplee una vía parenteral. Así, por ejemplo, para la administración intravenosa, se usará en general una dosis en el intervalo de, por ejemplo, 0,5 mg a 30 mg por kg de peso corporal. De manera similar, para la administración por inhalación, se usará una dosis en el intervalo de, por ejemplo, 0,5 mg a 25 mg por kg de peso corporal. Se prefiere, sin embargo, la administración oral.

La elevación de la actividad de GLK descrita en la presente memoria puede aplicarse como tratamiento único o combinado con otra u otras sustancias y/o tratamientos para la indicación que se esté tratando. Dicho tratamiento conjunto puede conseguirse por medio de la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. El tratamiento simultáneo puede ser en un único comprimido o en comprimidos separados. Por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes mellitus, la quimioterapia puede incluir las siguientes categorías principales de tratamiento:

- 1) Insulina y análogos de insulina;
- 2) Secretagogos de insulina que incluyen sulfonilureas (por ejemplo glibenclamida, glipizida), reguladores de glucosa prandial (por ejemplo repaglinida, nateglinida);
- 3) Agentes que mejoran la acción de la incretina (por ejemplo, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV y agonistas de GLP-1);
- 4) Agentes sensibilizadores de insulina, que incluyen agonistas de PPAR gamma (por ejemplo pioglitazona y rosiglitazona) y agentes con actividad PPAR alfa y gamma combinadas;
- 5) Agentes que modulan el equilibrio hepático de la glucosa (por ejemplo, metformina, inhibidores de la fructosa 1,6 bisfosfatasa, inhibidores de la glucógeno fosforilasa, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa);
- 6) Agentes diseñados para reducir la absorción de glucosa procedente del intestino (por ejemplo, acarbosa);
- 7) Agentes que impiden la reabsorción renal de la glucosa (inhibidores de SGLT);
- 8) Agentes diseñados para tratar las complicaciones de una hiperglucemia prolongada (por ejemplo, inhibidores de la aldosa reductasa);
- 9) Agentes anti-obesidad (por ejemplo, sibutramina y orlistat);
- 10) Agentes antilipídicos tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ej., estatinas); agonistas de PPAR $\alpha$  (fibratos, por ej., gemfibrozil); secuestrantes de ácidos biliares (colestiramina); inhibidores de la absorción del colesterol (estanoles vegetales, inhibidores sintéticos); inhibidores de la absorción de ácidos biliares (IBATi) y ácido nicotínico y análogos (niacina y formulaciones de liberación lenta);
- 11) Agentes antihipertensivos tales como, bloqueadores  $\beta$  (por ejemplo atenolol, inderal); inhibidores de la ECA (por ej., lisinopril); antagonistas de calcio (por ej., nifedipina); antagonistas de los receptores de angiotensina (por ej., candesartan), antagonistas  $\alpha$  y agentes diuréticos (por ej., furosemina, benzotiazida);
- 12) Moduladores de hemostasis tales como antitrombóticos, activadores de fibrinólisis y agentes antiplaquetas; antagonistas de trombina; inhibidores del factor Xa; inhibidores del factor VIIa); agentes antiplaquetas (por ej., aspirina, clopidogrel); anticoagulantes (heparina y análogos de bajo peso molecular, hirudina) y warfarina;
- 13) Agentes que antagonizan las acciones del glucagón; y
- 14) Agentes antiinflamatorios tales como antiinflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina) y antiinflamatorios esteroides (por ejemplo, cortisona).

El compuesto de la invención, o una sal del mismo, puede prepararse por cualquier procedimiento conocido aplicable a la preparación de dichos compuestos o compuestos relacionados estructuralmente. Los grupos funcionales pueden protegerse y desprotegerse usando métodos convencionales. Como ejemplos de grupos protectores tales como grupos protectores de amino y ácidos carboxílicos (así como medios de formación y desprotección eventual), véase T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "*Protective Groups in Organic Synthesis*", Segunda Edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Los siguientes ejemplos tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de esta solicitud. Cada compuesto ilustrado representa un aspecto particular e independiente de la invención. En los siguientes Ejemplos no limitantes, a menos que se indique lo contrario:

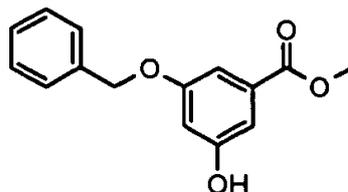
- 10 (i) las evaporaciones se llevaron a cabo por evaporación rotatoria al vacío y los procedimientos del tratamiento final se llevaron a cabo después de retirar por filtración los sólidos residuales, tales como agentes de secado;
- (ii) las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, es decir, en el intervalo de 18-25°C, y en una atmósfera de gas inerte tal como argón o nitrógeno;
- (iii) los rendimientos se proporcionan sólo como ilustración y no son necesariamente los máximos alcanzables;
- 15 (iv) las estructuras de los productos finales de la Fórmula (I) se confirmaron por resonancia magnética nuclear (generalmente de protones) (RMN) con una fuerza de campo (para el protón) de 300 MHz (usando generalmente un dispositivo Varian Gemini 2000) o 400 MHz (usando generalmente un dispositivo Bruker Avance DPX400), a menos que se indique lo contrario, y técnicas de espectrometría de masas; los valores de los desplazamientos químicos de resonancia magnética de protones se determinaron en la escala delta y las
- 20 multiplicidades máximas se muestran de la forma siguiente: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; a, señal ancha; q, cuarteto, quin, quinteto;
- (v) los productos intermedios no se caracterizaron generalmente de forma completa, y la pureza se evaluó por cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), análisis de infrarrojos (IR) o RMN;
- 25 (vi) la purificación por cromatografía se refiere, de manera general, a cromatografía instantánea en columna, sobre sílice a menos que se indique lo contrario. La cromatografía en columna se llevó a cabo, de manera general, usando cartuchos de sílice pre-rellenos (desde 4 g hasta 400 g) tales como Redisep® (disponible, por ejemplo, en Presearch Ltd, Hitchin, Herts, RU) o Biotage (Biotage UK Ltd, Hertford, Herts, RU), eluidos usando un sistema de bomba y colector de fracciones. La purificación por métodos de Extracción en Fase Sólida (SPE)
- 30 se refiere, en general, al uso de cartuchos de cromatografía rellenos con materiales de SPE tales como columnas ISOLUTE® SCX-2 (disponibles, por ejemplo, en International Sorbent Technology Ltd, Dryffryn Business Park, Hengoed, Mid Glamorgan, RU);
- (vii) los datos de espectros de masas (MS) se generaron en un sistema LCMS, en donde el componente de HPLC comprendió, de manera general, un equipo Agilent 1100 o Waters Alliance HT (2790 & 2795), y se
- 35 ejecutó en una columna Phenomenex Gemini C18 5 µm, 50 x 2 mm (o similar), eluyendo con un eluyente ácido (por ejemplo, usando un gradiente entre 0 - 95% de agua/acetonitrilo con 5% de una mezcla de ácido fórmico al 1% en 50:50 de agua/acetonitrilo (v/v); o usando un sistema disolvente equivalente con metanol en lugar de acetonitrilo), o con un eluyente básico (por ejemplo, usando un gradiente entre 0 - 95% de agua/acetonitrilo con 5% de una mezcla de amoniaco 880 al 0,1% en acetonitrilo); y el componente MS comprendió generalmente un
- 40 espectrómetro Waters ZQ. Se generan cromatogramas de la intensidad de pico base positiva y negativa por Electropulverización (ESI), y el cromatograma de absorción total UV de 220-300 nm, y se dan los valores para m/z; en general, sólo se informa sobre los iones que indican la masa parental y, a menos que se indique lo contrario, el valor citado es (M-H);
- (viii) Los reactores de microondas adecuados incluyen "Smith Creator", "CEM Explorer", "Biotage Initiator sixty"
- 45 y "Biotage Initiator eight".
- (ix) Los puntos de fusión se determinaron, en general, por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC); por lo general, el análisis se llevó a cabo usando equipos tales como Mettler DSC822e o Mettler DSC820. Las muestras típicamente menores de 5 mg de material, contenido en un recipiente de aluminio de 40 µl equipado con una tapa perforada, se calentaron en el intervalo de temperatura de 25°C a 325°C a una velocidad de calentamiento constante de 10°C por minuto. Se usó un gas de purga que emplea nitrógeno a un caudal de 100 ml por minuto. Se entenderá que los valores de temperatura de inicio y/o máximos de la DSC pueden variar ligeramente de un aparato a otro, de un método a otro o de una muestra a otra, y así los valores indicados no se deben considerar absolutos. Se observará que algunas muestras pueden ser solvatos, lo cual también puede
- 50 afectar a los puntos de fusión.

#### 55 Abreviaturas

DCM            diclorometano

	DEAD	azodicarboxilato de dietilo
	DIAD	azodicarboxilato de diisopropilo;
	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMA	dimetilacetamida
5	DMSO	dimetilsulfóxido
	DMF	dimetilformamida
	EDAC/EDC	Hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida;
	HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	HPLC	cromatografía líquida de alta presión;
10	HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa;
	LCMS	cromatografía líquida / espectroscopia de masas;
	NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona;
	RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear;
	TA	Temperatura ambiente
15	THF	tetrahidrofurano
	TFA	ácido trifluoroacético
	CDCl <sub>3</sub>	deuterocloroformo
	MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio
	NaHMDS	hexametildisilazida de sodio
20	Todos los nombres de los compuestos se dedujeron usando el paquete informático ACD NAME.	

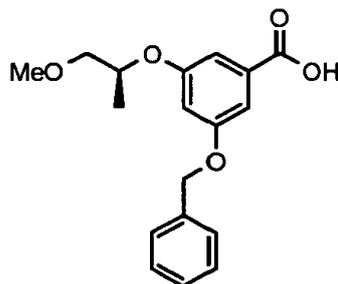
3-Hidroxi-5-[[fenilmetil]oxi]benzoato de metilo



A una solución agitada de 3,5-dihidroxi benzoato de metilo (5,95 moles) en DMF (6 l) se le agregó carbonato de potasio (9 moles) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. A esto se agregó lentamente bromuro de bencilo (8,42 moles) durante 1 hora, con una ligera temperatura exotérmica, y se agitó la mezcla de reacción durante la noche, a temperatura ambiente. La reacción se extinguió con cuidado, usando una solución de cloruro de amonio (5 l) seguido por agua (35 l). Se extrajo la suspensión acuosa con DCM (1 x 3 l y 2 x 5 l). Se lavaron los extractos combinados con agua (10 l) y se secó durante la noche (MgSO<sub>4</sub>). Se evaporó la solución al vacío y se cromatografió el producto en bruto en 3 lotes (columna de desorción instantánea, 3 x 2 kg de sílice, eluyendo con un gradiente que consistió en hexano que contuvo 10% de DCM, a DCM puro, a DCM que contuvo 50% de acetato de etilo) para eliminar el material de partida. Se cromatografió además el eluyente bruto en lotes de 175 g (HPLC Amicon, 5 kg de sílice de fase normal, eluyendo con isohexano con 20% v/v de acetato de etilo) para dar el compuesto deseado (rendimiento de 21%). <sup>1</sup>H RMN δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 3,8 (s, 3H), 5,1 (s, 2H), 6,65 (m, 1H), 7,0 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,3-7,5 (m, 5H), 9,85 (s a, 1H).

35

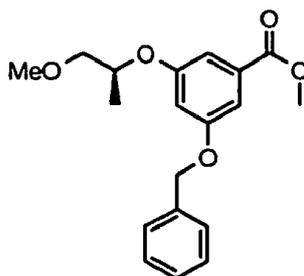
Ácido 3-[(1S)-2-metoxi-(1-metiletil)oxi]-5-[[fenilmetil]oxi]benzoico



Se trató una solución de 3-[(1S)-2-metoxi-(1-metiletil)oxi]-5-[[fenilmetil]oxi] benzoato de metilo (77,4 mmoles) en una mezcla de THF (232 ml) y metanol (232 ml) con una solución de hidróxido de sodio 2 M (232 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción durante 4 horas a temperatura ambiente. Se diluyó la solución resultante con agua (250 ml) y la mayor parte del disolvente orgánico se retiró al vacío. Se lavó la suspensión resultante con éter dietílico (3 x 200 ml) y se desecharon los lavados orgánicos. Se acidificó la solución acuosa resultante a pH 4 con una solución de ácido clorhídrico 2 M y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Se combinaron los extractos, se lavó con salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó para dar el compuesto deseado (rendimiento de 99%).

<sup>1</sup>H RMN δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,20 (d, 3H); 3,46 (m, 2H); 4,64 (m, 1H); 5,15 (s, 2H); 6,83 (t ap, 1H); 7,06 (s, 1H); 7,13 (s, 1H); 7,30-7,49 (m, 5H); 12,67 (s a, 1H)

3-[(1S)-2-metoxi-(1-metiletil)oxi]-5-[[fenilmetil]oxi]benzoato de metilo



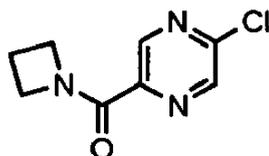
A una solución de 3-hidroxi-5-[[fenilmetil]oxi]benzoato de metilo (77,4 mmoles) en THF se agregó trifenilfosfina soportada sobre polímero (51,7 g de una carga de 3 mmoles/g, 155 mmoles) y (*R*)-(-)-1-metoxi-2-propanol (102 mmoles). Se protegió la solución agitada con argón y se dejó enfriar en un baño de hielo. Se agregó una solución de DIAD (116 mmoles) gota a gota mediante una jeringa durante 10 minutos. Se agitó la solución durante 20 minutos y se filtró, lavando el residuo con THF (500 ml). Se combinaron el filtrado y los lavados y se evaporaron para dar el compuesto deseado, que se usó sin purificación adicional.

<sup>1</sup>H RMN δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 3,26 (s, 3H); 3,44 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,63 (m, 1H); 5,14 (s, 2H); 6,85 (s, 1H); 7,05 (s, 1H); 7,11 (s, 1H); 7,30-7,47 (m, 5H)

El espectro de <sup>1</sup>H RMN también contuvo señales consistentes con una pequeña cantidad de 1,2-dicarboxilato de bis(1-metiletil)hidrazina.

La preparación de 2-(azetidin-1-il-carbonil)-5-cloropirazina se describe más adelante:

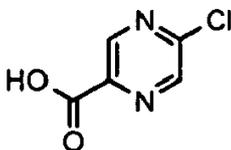
2-(Azetidin-1-il-carbonil)-5-cloropirazina



Se agregó cloruro de oxalilo (1,55 ml, 17,48 mmol), seguido de DMF (2 gotas), a una mezcla de ácido 5-cloropirazina-2-carboxílico (2,31 g, 14,57 mmol) en DCM (40 ml). Se agitó la reacción a TA durante 2 horas, tras lo cual se eliminaron al vacío las sustancias volátiles. El residuo se recogió en DCM (40 ml) y se agregaron azetidina (1,08 ml, 16,03 mmol) y trietilamina (4,46 ml, 32,06 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 72 horas. Las sustancias volátiles se retiraron al vacío y se agregó al residuo acetato de etilo (100 ml). Los elementos orgánicos se lavaron con agua (100 ml), ácido cítrico (50 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml), salmuera (50 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y el disolvente se retiró al vacío para dar un sólido amarillo. El residuo se cromatografió

sobre sílice y se eluyó con un gradiente de acetato de etilo al 50-100% en iso-hexano para dar el compuesto deseado como un sólido amarillo (2,38 g).  $^1\text{H RMN } \delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,35 - 2,42 (2H, m), 4,26 (2H, t), 4,67 (2H, t), 8,52 (1H, d), 9,09 (1H, d);  $m/z$  198 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Ácido 5-cloropirazina-2-carboxílico



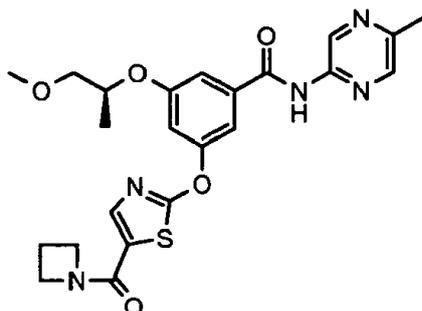
5

A una solución de 5-cloropirazina-2-carboxilato de metilo (120 mg, 0,70 mmol) en una mezcla de acetonitrilo (2 ml) y DMF (1 ml), se agregó cloruro de litio (295 mg, 6,95 mmol). La suspensión se calentó a 160°C durante 5 min en un horno microondas "Smith creator" y pasado este tiempo, la reacción se diluyó con agua (10 ml). Se agregó una solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (30 ml). Se descartaron las capas orgánicas combinadas y la capa acuosa se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico 1N. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (20 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 20 ml), salmuera (10 ml) y se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ). Se retiraron las sustancias volátiles para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (68 mg).

10

$^1\text{H RMN } \delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7,20 (1H, s ancho), 8,72 (1H, s), 9,21 - 9,21 (1H, m);  $m/z$  157 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^+$ .

15 Ejemplo de Referencia 34: 3-[[5-(azetidín-1-il-carbonil)-1,3-tiazol-2-il]oxi]-5-[[1S]-1-metil-2-(metiloxietil)oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida



20

Se agregó carbonato de cesio (489 mg, 1,5 mmol) a una solución de 3-hidroxi-5-[[1S]-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida (159 mg, 0,5 mmol) y 5-(azetidín-1-il-carbonil)-2-cloro-1,3-tiazol (152 mg, 0,75 mmol) en acetonitrilo (5 ml), y la mezcla agitada se calentó a 120°C en un reactor de microondas durante 1 hora. La mezcla se enfrió a temperatura y presión ambientales, el acetonitrilo se evaporó al vacío, el residuo se distribuyó entre agua (25 ml) y acetato de etilo (50 ml), la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó hasta un residuo que se cromatógrafió sobre sílice, eluyendo con acetato de etilo, para dar el producto deseado (181 mg).

25

$^1\text{H RMN } \delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 1,3 (d, 3H), 2,35 (m, 2H), 2,5 (s, 3H), 3,3 (s, 3H), 3,45 - 3,55 (m, 2H), 4,1 - 4,4 (m, 4H), 4,5 (m, 1H), 7,0 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,4 (s, 1H) y 9,45 (s, 1H).  $m/z$  484 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

De manera análoga, se sintetizó el compuesto siguiente a partir de 3-hidroxi-5-[[1S]-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida y el heterociclo halogenado apropiado:

Ejemplo	Estructura	m/z	RMN
34b***		479 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$	$^1\text{H RMN } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1,3 (d, 3H), 2,3 (m, 2H), 2,5 (s, 3H), 3,3 (s, 3H), 3,45 - 3,55 (m, 2H), 4,2 (t, 2H), 4,55 (m, 1H), 4,65 (t, 2H), 6,9 (d, 1H), 7,25 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,8 (s, 1H) y 9,45 (s, 1H).

\*\*\* Ejemplo 34b, también se preparó 3-[[5-(azetidín-1-il-carbonil)pirazin-2-il]oxi]-5-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida del modo siguiente.

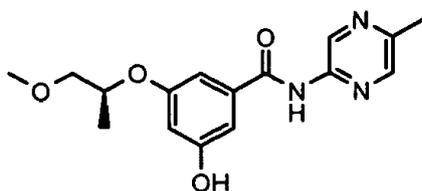
Una mezcla de 3-hidroxi-5-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida (25,4 g, 80,0 mmol), 2-(azetidín-1-il-carbonil)-5-cloropirazina (17,4 g, 88,0 mmol) y carbonato de potasio (33,1 g, 240 mmol) en acetonitrilo (254 ml) se calentó a 60°C durante 24 horas. El disolvente se retiró por evaporación, y el residuo se distribuyó entre acetato de etilo (15 vol) y agua (10 vol). Se separaron las capas, la capa acuosa se extrajo adicionalmente en acetato de etilo (2 x 10 vol) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 5 vol), salmuera (5 vol), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron al vacío. Se cromatografió el residuo sobre sílice, eluyendo con acetato de etilo, para dar el producto deseado como una espuma (33,7 g). El material puro se disolvió en éter *terc*-butilmetílico caliente (30 vol), se sembró con una muestra cristalina genuina (las semillas se aislaron de una cristalización a pequeña escala, en la que el material se disolvió en una cantidad mínima de éter *terc*-butilmetílico caliente, a continuación se agregó isohexano y se rascó el matraz para promover la cristalización) y se agitó durante la noche. La mezcla se enfrió y el material cristalino (inicio de la fusión a 110,3°C) se recolectó por filtración (29,1 g).

<sup>1</sup>H RMN δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,27 (d, 3H), 2,30 (quin, 2H), 2,49 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,47 - 3,56 (m, 2H), 4,10 (t, 2H), 4,57 (t, 2H), 4,79 (dt, 1H), 7,13 (t, 1H), 7,48 (dt, 1H), 7,57 (dt, 1H), 8,36 (d, 1H), 8,56 (d, 1H), 8,69 (d, 1H), 9,26 (d, 1H), 11,00 (s, 1H); *m/z* 479 (M+H)<sup>+</sup>.

Esta forma cristalina se pudo convertir en una forma cristalina diferente depositando aproximadamente 30 mg de material en un vial con una mosca magnética y agregando aproximadamente 1 ml de agua. A esto se agregaron unas pocas gotas (3) de metanol, y se selló el vial con un tapón. Se agitó entonces la suspensión en una placa magnética a TA (25°C). Después de 3 días, se retiró la muestra de la placa, se retiró el tapón y se dejó secar la suspensión bajo condiciones ambientales. La nueva forma cristalina (inicio de la fusión, 110,2°C) demostró ser diferente por análisis de XRPD.

El compuesto del título se puede cristalizar también agitando una suspensión del compuesto en agua. La preparación de 3-hidroxi-5-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida se describe más adelante:

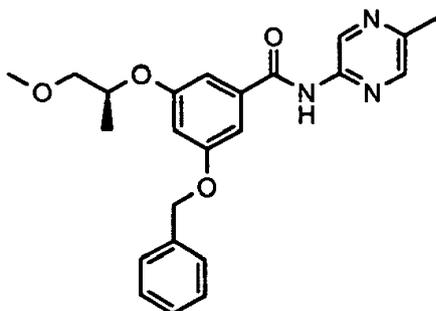
3-Hidroxi-5-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida



Se agregó paladio sobre carbón al 10% (700 mg) a una solución de 3-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)-5-[[fenilmetil]oxi]benzamida (7,0 g, 17,2 mmol) en etanol (125 ml), y la mezcla se agitó a TA bajo atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. El catalizador se retiró por filtración y el etanol se evaporó al vacío. El residuo cristalizó en acetato de etilo para dar el compuesto deseado (4,22 g). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,25 (d, 3H), 2,5 (s, 3H), 3,3 (s, 3H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 4,5 (m, 1H), 6,3 (señal ancha, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,9 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,45 (s, 1H) y 9,5 (s, 1H). *m/z* 318 (M+H)<sup>+</sup>.

Esta reacción también se llevó a cabo usando metanol como disolvente y aplicando una presión de hidrógeno de 5 bar.

3-[[1(S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi]-N-(5-metilpirazin-2-il)-5-[[fenilmetil]oxi]benzamida



A una solución de ácido 3-[[1(S)-2-metoxi-(1-metiletil)oxi]-5-[[fenilmetil]oxi]benzoico (6,32 g, 20,0 mmol) en DCM (100 ml) se agregó cloruro de oxalilo (2,1 ml, 24,0 mmol), y se agitó la mezcla a TA durante 4 horas. La mezcla se evaporó al vacío hasta un residuo que se recogió en DCM (25 ml), y se agregó a una mezcla agitada de 2-amino-5-metilpirazina (2,29 g, 21,0 mmol) y piridina (1,94 ml, 24,0 mmol) en DCM (100 ml) a 5°C - 10°C. La mezcla se agitó a

TA durante 18 horas y el DCM se evaporó al vacío. El residuo se distribuyó entre agua (50 ml) y acetato de etilo (150 ml), la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó ( $MgSO_4$ ) y se evaporó hasta un residuo que se cromatografió sobre sílice, eluyendo con acetato de etilo al 50% en isohexano, para dar el compuesto deseado (7,0 g).  $^1H$  RMN  $\delta$  ( $CDCl_3$ ): 1,3 (d, 3H), 2,5 (s, 3H), 3,3 (s, 3H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 4,5 (m, 1H), 5,0 (s, 2H), 6,7 (s, 1H), 7,0 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,35 (m, 5H), 8,05 (s, 1H), 8,3 (s, 1H) y 9,5 (s, 1H).  $m/z$  408 (M+H) $^+$ .

La preparación de 2-amino-5-metilpirazina se describe en la bibliografía [*Tetrahedron Lett.* 2002, 9287].

La preparación del ácido 3-[(1S)-2-metoxi-(1-metiletil)oxi]-5-[[fenilmetil]oxi]benzoico se ha descrito anteriormente.

La preparación del heterociclo halogenado 2-(azetidín-1-il-carbonil)-5-cloropirazina se ha descrito anteriormente.

## PARTE BIOLÓGICA

### 10 Pruebas:

Los efectos biológicos del compuesto de la invención pueden ensayarse de la siguiente manera:

#### (1) Actividad enzimática

15 La actividad enzimática de GLK pancreática humana recombinante se puede medir por incubación de GLK, ATP y glucosa. La velocidad de formación de producto se puede determinar acoplado el ensayo a un sistema de G-6-P deshidrogenasa NADP/NADPH y midiendo el aumento lineal en el tiempo de la densidad óptica a 340 nm (Matschinsky et al 1993). La activación de GLK mediante los compuestos se puede evaluar usando esta prueba en presencia o ausencia de GLKRP tal como se describe en Brocklehurst et al (*Diabetes* 2004, 53, 535-541).

#### Producción de GLK y GLKRP recombinantes:

20 Se obtuvo ADNc de GLK y GLKRP humanas por PCR de ARNm pancreático y hepático humano, respectivamente, usando técnicas establecidas, descritas en Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. Los cebadores para PCR se diseñaron según las secuencias de ADNc de GLK y GLKRP mostradas en Tanizawa et al 1991 y Bonthron, D.T. et al 1.994 (corregidas más tarde en Warner, J. P. 1995).

#### *Clonación en vectores Bluescript II*

25 El ADNc de GLK y GLKRP se clonó en *E. coli* usando pBluescript II (Short et al 1.998), un sistema vector de clonación recombinante similar al empleado por Yanisch-Perron C et al (1985), que comprende un replicón basado en *colEI*, portador de un fragmento de ADN poli-enlazador que contiene múltiples sitios de restricción única, flanqueado por secuencias promotoras del bacteriófago T3 y T7; un origen de replicación del fago filamentosos y un gen marcador de resistencia farmacológica a ampicilina.

#### Transformaciones

30 Las transformaciones de *E. coli* se llevaron a cabo generalmente por electroporación. Cultivos de 400 ml de cepas DH5a o BL21(DE3) se cultivaron en caldo L a una DO 600 de 0,5 y se recogieron por centrifugación a 2.000 g. Las células se lavaron dos veces en agua desionizada helada, se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10% y se almacenaron en partes alícuotas a  $-70^\circ C$ . Se desalaron las mezclas de ligación usando membranas Millipore V series<sup>TM</sup> (0,0025 mm de tamaño de poro). Se incubaron 40 ml de células con 1 ml de mezcla de ligación o plásmido de ADN en hielo, durante 10 minutos, en cubetas de electroporación de 0,2 cm y después se pulsaron usando un aparato Gene Pulser® (BioRad) a  $0,5 \text{ kVcm}^{-1}$ , 250 mF. Los transformantes se seleccionaron en L-agar enriquecido con tetraciclina a 10 mg/ml o ampicilina a 100 mg/ml.

#### Expresión

40 La GLK se expresó a partir del vector pTB375NBSE en células *E. coli* BL21, produciendo una proteína recombinante que contuvo una etiqueta 6-His inmediatamente adyacente a la metionina N-terminal. De manera alternativa, otro vector adecuado es pET21(+)-DNA, Novagen, número de Catálogo 697703. La etiqueta 6-His se usó para permitir la purificación de la proteína recombinante en una columna empaquetada con agarosa níquel - ácido nitrilo-triacético adquirido en Qiagen (nº de catálogo 30250).

45 La GLKRP se expresó a partir del vector pFLAG CTC (IBI Kodak) en células *E. coli* BL21, produciendo una proteína recombinante que contuvo una etiqueta FLAG C-terminal. La proteína se purificó inicialmente por intercambio iónico sobre DEAE Sepharosa, seguido por la utilización de la etiqueta FLAG para la purificación final en una columna de inmunoafinidad anti-FLAG M2 adquirida en Sigma-Aldrich (nº de catálogo A1205).

#### (2) Prueba de la Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

50 Se llevaron a cabo pruebas de tolerancia oral a la glucosa en ratas fa/fa obesas, Zucker, conscientes (edad 12-13 semanas o mayores), alimentadas con una dieta rica en grasas (45 % kcal de grasa), durante al menos dos

semanas antes de la experimentación. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 2 horas antes de iniciar los experimentos. 120 minutos antes de la administración oral de una solución de glucosa, a una dosis de 2 g/kg de peso corporal, se administró por vía oral un compuesto de prueba o un vehículo. Se midieron los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro Accucheck de muestras de sangrado de la cola tomadas en tiempos diferentes antes y después de la administración de glucosa (periodo de tiempo de 60 minutos). Se generó una curva en el tiempo de los niveles de glucosa en sangre y se calculó el área bajo la curva (AUC) durante 120 minutos (en donde el tiempo de administración de glucosa fue tiempo cero). La reducción porcentual de las fluctuaciones de glucosa se determinó usando el AUC en el grupo de control con vehículo como reducción de cero por ciento.

El compuesto de la invención tiene, por lo general, una actividad de activación para la glucocinasa con una  $EC_{50}$  menor que aproximadamente  $1\mu\text{M}$  y, por lo general, menor que aproximadamente 500 nM.

#### Referencias bibliográficas

- 1 Printz, R. L., Magnuson, M. A. and Granner, D. K. (1993) Annual Review of Nutrition **13**, 463-96
- 2 DeFronzo, R. A. (1988) Diabetes **37**, 667-87
- 3 Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J. and Passa, P. (1993) New England Journal of Medicine **328**, 697-702
- 4 Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T. and Polonsky, K. S. (1996) Annual Review of Physiology **58**, 171-86
- 5 Velho, G., Petersen, K. F., Perseghin, G., Hwang, J. H., Rothman, D. L., Pueyo, M. E., Cline, G. W., Froguel, P. and Shulman, G. I. (1996) Journal of Clinical Investigation **98**, 1755-61
- 6 Christesen, H. B., Jacobsen, B. B., Odili, S., Buettger, C., Cuesta-Munoz, A., Hansen, T., Brusgaard, K., Massa, O., Magnuson, M. A., Shiota, C., Matschinsky, F. M. and Barbetti, F. (2002) Diabetes **51**, 1240-6
- 6a Gloyn, A.L., Noordam, K., Willemsen, M.A.A.P., Ellard, S., Lam, W.W.K., Campbell, I. W., Midgley, P., Shiota, C., Buettger, C., Magnuson, M.A., Matschinsky, F.M., and Hattersley, A.T.; Diabetes **52**: 2433-2440
- 7 Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C. A., Thornton, P. S., Permutt, M. A., Matschinsky, F. M. and Herold, K. C. (1998) New England Journal of Medicine **338**, 226-30

- 8 Caro, J. F., Triester, S., Patel, V. K., Tapscott, E. B., Frazier, N. L. and Dohm, G. L. (1995) *Hormone & Metabolic Research* **27**, 19-22
- 9 Desai, U. J., Slosberg, E. D., Boettcher, B. R., Caplan, S. L., Fanelli, B., Stephan, Z., Gunther, V. J., Kaleko, M. and Connelly, S. (2001) *Diabetes* **50**, 2287-95
- 10 Shiota, M., Postic, C., Fujimoto, Y., Jetton, T. L., Dixon, K., Pan, D., Grimsby, J., Grippo, J. F., Magnuson, M. A. and Cherrington, A. D. (2001) *Diabetes* **50**, 622-9
- 11 Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Bosch, F. and Valera, A. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7225-30
- 12 Seoane, J., Barbera, A., Telemaque-Potts, S., Newgard, C. B. and Guinovart, J. J. (1999) *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31833-8
- 13 Moore, M. C., Davis, S. N., Mann, S. L. and Cherrington, A. D. (2001) *Diabetes Care* **24**, 1882-7
- 14 Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Vazquez, P. and Blazquez, E. (2002) *Journal of Neurochemistry* **80**, 45-53
- 15 Lynch, R. M., Tompkins, L. S., Brooks, H. L., Dunn-Meynell, A. A. and Levin, B. E. (2000) *Diabetes* **49**, 693-700
- 16 Roncero, I., Alvarez, E., Vazquez, P. and Blazquez, E. (2000) *Journal of Neurochemistry* **74**, 1848-57
- 17 Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T. and Mobbs, C. V. (1999) *Diabetes* **48**, 1763-
- 18 Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H. and Pipeleers, D. G. (2001) *Diabetes* **50**, 1-11
- 19 Levin, B. E. (2001) *International Journal of Obesity* **25**, supplement 5, S68-S72.
- 20 Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Thorens, B. and Blazquez, E. (1996) *Journal of Neurochemistry* **66**, 920-7
- 21 Mobbs, C. V., Kow, L. M. and Yang, X. J. (2001) *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism* **281**, E649-54
- 22 Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A. and Routh, V. H. (1999) *American Journal of*
- 23 Spanswick, D., Smith, M. A., Groppi, V. E., Logan, S. D. and Ashford, M. L. (1997) *Nature* **390**, 521-5
- 24 Spanswick, D., Smith, M. A., Mirshamsi, S., Routh, V. H. and Ashford, M. L. (2000) *Nature Neuroscience* **3**, 757-8
- 25 Levin, B. E. and Dunn-Meynell, A. A. (1997) *Brain Research* **776**, 146-53
- 26 Levin, B. E., Govek, E. K. and Dunn-Meynell, A. A. (1998) *Brain Research* **808**, 317-9

- 27 Levin, B. E., Brown, K. L. and Dunn-Meynell, A. A. (1996) *Brain Research* **739**, 293-300
- 28 Rowe, I. C., Boden, P. R. and Ashford, M. L. (1996) *Journal of Physiology* **497**, 365-77
- 29 Fujimoto, K., Sakata, T., Arase, K., Kurata, K., Okabe, Y. and Shiraishi, T. (1985) *Life Sciences* **37**, 2475-82
- 30 Kurata, K., Fujimoto, K. and Sakata, T. (1989) *Metabolism: Clinical & Experimental* **38**, 46-51
- 31 Kurata, K., Fujimoto, K., Sakata, T., Etou, H. and Fukagawa, K. (1986) *Physiology & Behavior* **37**, 615-20
- 32 Jetton T.L., Liang Y., Pettepher C.C., Zimmerman E.C., Cox F.G., Horvath K., Matschinsky F.M., and Magnuson M.A., *J. Biol. Chem.*, Feb **1994**; **269**: 3641 - 3654
- 33 Reimann F. and Gribble F. M., *Diabetes* **2002** **51**: 2757-2763
- 34 Cheung A. T., Dayanandan B., Lewis J. T., Korbitt G. S., Rajotte R. V., Bryer-Ash M., Boylan M. O., Wolfe M. M., Kieffer T. J., *Science*, Vol 290, Issue 5498, **1959-1962, 8 December 2000**

**REIVINDICACIONES**

1. El compuesto 3-{{5-(azetidin-1-il-carbonil)pirazin-2-il]oxi}-5-(((1S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi)-N-(5-metilpirazin-2-il)benzamida o una sal del mismo.
- 5 2. El compuesto según la reivindicación 1, que es 3-{{5-(azetidin-1-il-carbonil)pirazin-2-il]oxi}-5-(((1S)-1-metil-2-(metiloxi)etil]oxi)-N-(5-metilpirazin-2-il)-benzamida.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, para ser usado como medicamento.
- 10 5. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, para ser usado en el tratamiento de la diabetes tipo 2.
6. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, para ser usado en el tratamiento de la obesidad.
7. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GLK.
- 15 8. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2.
9. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad.
10. Una combinación que comprende:  
un compuesto según la reivindicación 1 o 2; y
- 20 una o múltiples sustancias para el tratamiento de la diabetes y/o la obesidad.