(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 623 082**

(21) Número de solicitud: 201531786

(51) Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)
A61K 31/438 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

10.12.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

10.07.2017

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070868

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES;
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (CIBER) (20.0%) y
UNIVERSITAT DE BARCELONA (20.0%)

(72) Inventor/es:

CASTRO MORERA, Ana;
SANZ BIGORRA, Pascual;
QUESADA SÁNCHEZ, Sergio;
GARCÍA GIMENO, María Adelaida;
LUQUE GARRIGA, Francisco Javier y
BIDON-CHANAL BADIA, Axel

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **COMPUESTOS ESPIRANICOS DERIVADOS DE OXINDOL-PIRAZOLO [3,4-b] PIRIDINONA Y SUS USOS TERAPÉUTICOS**

(57) Resumen:

Compuestos espiranicos derivados de oxindol-pirazolo[3,4-b]piridinona y sus usos terapéuticos.

La presente invención se refiere a derivados de oxindol-pirazolo[3,4-b]piridinona, que actúan como moduladores de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y de su uso para el tratamiento y prevención de enfermedades o trastornos regulados por AMPK. Por tanto, estos compuestos pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, neurológicas y cáncer.

ES 2 623 082 A1

COMPUESTOS ESPIRANICOS DERIVADOS DE OXINDOL-PIRAZOLO [3,4-b] PIRIDINONA Y SUS USOS TERAPÉUTICOS

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a una serie de compuestos derivados de oxindol-pirazolo[3,4-b]piridinona y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, neurológicas y cáncer. También hace referencia a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos. Por tanto, la invención pertenece al campo de la química farmacéutica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Obesidad, diabetes de tipo 2, hipertensión, cáncer y enfermedades cardiovasculares comportan graves alteraciones del metabolismo de glucosa o lípidos y afectan severamente a la salud y calidad de vida de los individuos afectados. La creciente prevalencia de estas enfermedades hace que el hallazgo de nuevas dianas farmacológicas para su tratamiento sea una tarea urgente.

En este contexto, la serina/treonina proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una diana biológica relevante para este tipo de patologías, ya que actúa como un sensor clave del estado energético celular, coordinando rutas metabólicas y procesos no metabólicos con el objetivo de equilibrar el nivel de suministro de nutrientes y la demanda energética. AMPK responde a cambios en los niveles de AMP intracelular, estimulando rutas asociadas con la generación de ATP y/o inhibiendo procesos que consumen ATP. En consecuencia, la síntesis de glucosa, lípidos y proteínas así como el crecimiento celular se inhiben, mientras que la oxidación de ácidos grasos y la recaptación de glucosa se activan. [Hardie DG; Ross FA et al. 2012 Nature Reviews 13: 251-262]. Así, compuestos capaces de regular el metabolismo energético a través de la modulación de AMPK constituyen una estrategia prometedora para la prevención y el tratamiento de este tipo de enfermedades.

A nivel farmacológico, el concepto de AMPK como diana potencial para tratar el síndrome metabólico se ha visto apoyado por el descubrimiento de dos clases principales de fármacos antidiabéticos, tiazolidindionas (rosiglitazona, troglitazona y pioglitazona) y biguanidas (metformina y fenformina), que activan AMPK en células en

cultivo e *in vivo*. Tradicionalmente rosiglitazona es considerada un agonista de PPARγ y ejerce sus efectos antidiabéticos a través de la diferenciación de adipocitos. AMPK podría participar en los efectos antidiabéticos de rosiglitazona (Kadowaki T. et al., The Journal of Clinical Investigation 116:1784-1792, 2006]. A su vez, metformina podría activar AMPK *in vitro* e *in vivo* mediante la inhibición del complejo I [Zhou G. et al., The Journal of Clinical Investigation 108:1167-1174, 2001], y el efecto hipoglucémico podría ser completamente bloqueado por la inactivación de la quinasa LKB1, confirmando el papel clave de AMPK en la mediación del efecto antidiabético de metformina [Shaw R.J. et al., Science (New York) N.Y. 310:1642-1646, 2005].

De igual manera, la acción de AMPK sobre el metabolismo energético sería responsable de los efectos beneficiosos que la activación de esta quinasa tiene en el corazón, especialmente en la protección contra daños producidos en isquemia-reperfusión. También se ha visto que la activación de AMPK disminuye la hipertrofia cardíaca y el riesgo de fallo cardíaco, por lo que la administración de activadores de AMPK estaría recomendada en estas patologías [Zaha VG y Young LH. 2012 Circ. Res. 111: 800-814].

Más recientemente se ha hecho evidente la participación de AMPK en la regulación del metabolismo, no solamente celular sino también corporal. Se ha demostrado que la hormona leptina derivada de los adipocitos lleva a una estimulación de AMPK y, por tanto, a un incremento en la oxidación de ácidos grasos en músculos esqueléticos [Minokoshi Y. et al, 2002, Nature, 415, 339]. La adiponectina, otra hormona derivada de adipocitos que lleva a un metabolismo mejorado de carbohidratos y lípidos, estimula AMPK en hígado y en músculos esqueléticos [Yamanauchi T. et al., 2002, Nature Medicine, 8, 1288]. La activación de AMPK en estas circunstancias no parece ser debida a un incremento de los niveles celulares de AMP, sino más bien a la fosforilación de la subunidad catalítica por una o más quinasas corriente arriba.

En base a las consecuencias metabólicas antes mencionadas de la activación de AMPK, cabe esperar efectos beneficiosos profundos de la activación *in vivo* de AMPK. Así, en hígado la expresión génica de enzimas gluconeogénicas estaría disminuida, con lo que se reduciría la producción de glucosa hepática y se mejoraría la homeostasis global de glucosa. Por otra parte, la inhibición directa y/o la expresión reducida de enzimas clave en el metabolismo de lípidos reduciría la síntesis de los mismos y además se incrementaría la oxidación de ácidos grasos. Esto comportaría

una mejora de la homeostasis de glucosa y, debido a una reducción en la acumulación de triglicéridos en músculo esquelético, también una acción mejorada de insulina. Por tanto, la combinación de estos efectos en síndrome metabólico debería reducir significativamente el riesgo de adquisición de enfermedades cardiovasculares.

AMPK participa en la regulación de la ruta PI3k/Akt/mTOR. La mTOR es una enzima serina/treonina quinasa que regula la síntesis de proteínas. AMPK regula negativamente la ruta mTOR a varios niveles. Primero, AMPK fosforila y activa la proteína de la esclerosis tuberosa 2 (TSC2), que es un inhibidor de mTOR. En segundo lugar, AMPK fosforila e inactiva a la proteína raptor, una subunidad del complejo en el que se encuentra mTOR, dando lugar a la inactivación del complejo. De esta manera, la activación de AMPK inhibe el crecimiento celular y protege a las células de la apoptosis inducida por ayuno de glucosa [Burkewitz K, Zhang Y and Mair W.B. 2014 Cell. Metabolism. 20: 10-25] La AMPK también puede ser una diana terapéutica para muchos cánceres que tienen acción constitutiva sobre la ruta de señalización PI3K/Akt. El tratamiento de diversas líneas celulares de cáncer mediante AICAR (5-amino-1-β-D-ribofuranosil-imidazol-4-carboxamida), un análogo de AMP capaz de estimular AMPK, atenúa la proliferación celular tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. 2005 J. Biol. Chem. 280:39582-39593].

La activación de AMPK por AICAR reduce la expresión de las enzimas lipogénicas FAS y ACC, dando como resultado la supresión de la proliferación en células cancerosas prostáticas. Muchas células cancerosas despliegan una velocidad marcadamente incrementada de síntesis de ácidos grasos *de novo* correlacionada con altos niveles de FAS. La inhibición de FAS suprime la proliferación de células cancerosas e induce la muerte celular. Así, la activación de AMPK y la inhibición de la actividad de FAS es una diana para la terapia farmacológica de este tipo de cáncer.

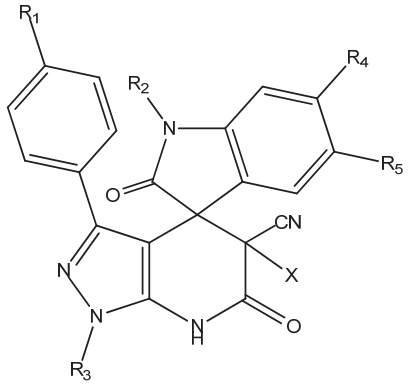
Por otra parte, AICAR es un activador de AMPK que ejerce un efecto antiinflamatorio atenuando la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Asimismo, AICAR atenúa la progresión de la encefalomielitis autoinmune experimental, limitando la infiltración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica, por lo que se ha sugerido que los agentes activadores de AMPK actúan como agentes anti-inflamatorios y pueden mantener un potencial terapéutico en la enfermedad de Krabbe/Twitcher [Giri S et al. 2008, J. Neurochem., 105: 1820-1833].

También se ha descrito que la activación de AMPK juega un papel neuroprotector en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Así, su activación puede ejercer un efecto neuroprotector a través de la regulación de los niveles de PGC-1 y UCP2 frente al daño cerebral inducido durante estados de epilepsia [Han et al., 2011, Neurosci Lett 500: 133-138] o a través de su papel en procesos de excitoxicidad y apoptosis en neuronas de hipocampo [Ullah et al., 2014, CNS Neurosci. Ther. 20: 327-338].

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han encontrado una familia de compuestos caracterizados por ser potentes moduladores de AMPK. Por tanto, los compuestos de la invención pueden resultar útiles en el tratamiento o profilaxis de enfermedades que se relacionan con la regulación de dicha enzima.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



(I)

o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables correspondientes, en la que R_1-R_5 y X se definen a continuación.

R_1 se selecciona entre hidrógeno, halógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, OR_a, SR_a, $COO(R_a)$, CF_3, $N(R_a)_2$ y un grupo arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido. Preferiblemente R_1 se selecciona entre cloro, bromo y un grupo fenilo sustituido.

R_2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido y COR_a. Preferiblemente R_2 es hidrógeno.

R_3 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido y arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido. Preferiblemente R_3 se selecciona entre hidrógeno, un grupo fenilo y 4-metoxifenilo.

R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido, halógeno y grupo nitro (-NO_2). Preferiblemente R_4 se selecciona entre hidrógeno y flúor, y R_5 se selecciona entre hidrógeno, flúor, un grupo nitro y un grupo fenilo.

X es un halógeno, preferiblemente flúor.

R_a se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido y arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido.

Donde los sustituyentes se seleccionan de entre OR', =O, SR', SOR', SO_2R', NO_2, NHR', $N(R')_2$, =N-R', NHCOR', $N(COR')_2$, $NHSO_2R'$, NR'C(=NR')NHR', CN, halógeno, C(O)R', COOR', OC(O)R', CONHR', $CON(R')_2$, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, alquenilo (C_2-C_{10}) sustituido o no sustituido, alquinilo (C_2-C_{10}) sustituido o no sustituido, arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido y heterociclo (C_5-C_{18}) sustituido o no sustituido, donde cada grupo R' es seleccionado independientemente entre H, OH, NO_2, NH_2, SH, CN, halógeno, O, C(O)H, C(O)alquilo, COOH, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, alquenilo (C_2-C_{10}) sustituido o no sustituido, alquinilo (C_2-C_{10}) sustituido o no sustituido, arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido y heterociclo (C_5-C_{18}) sustituido o no sustituido.

El término "halógeno", tal como se entiende en la presente invención, incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El término “alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada, saturada, que tiene de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6 y más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente descrito anteriormente.

El término “alquenilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo que contiene al menos un enlace doble carbono-carbono, lineal o ramificada, que tiene de 2 a 10, preferiblemente de 2 a 6 y más preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono.

Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente descrito anteriormente.

El término “alquinilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo que contiene al menos un enlace triple carbono-carbono, lineal o ramificada, que tiene de 2 a 10, preferiblemente de 2 a 6 y más preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono. Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente descrito anteriormente.

El término “arilo” se refiere a un anillo aromático, monocíclico o policíclico, que tiene de 6 a 18 átomos de carbono. Como ejemplos, se citan fenilo, naftilo, antranilo o fenantrilo, siendo preferido el fenilo. Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente descrito anteriormente. Cuando el radical arilo lleva 2 o más sustituyentes, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

El término “heteroarilo” se refiere a un anillo aromático de 5 a 18 miembros, opcionalmente substituido por al menos un sustituyente descrito anteriormente, que tiene uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, O, y S como átomos en el anillo. El heteroarilo puede ser un sistema de anillo mono-, bi- o tricíclico.

El término "sustituido" a menos que se especifique lo contrario, se refiere a la sustitución por uno o más sustituyentes (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) o cualquier combinación de los mismos de la lista de sustituyentes anteriormente mencionada. Cuando hay presentes dos o más sustituyentes, cada sustituyente puede ser igual o diferente.

Los grupos hidroxilos, tioles, aminas, ácidos pueden hallarse opcionalmente protegidos. Existe un gran número de grupos protectores de estos grupos funcionales, y son bien conocidos por el experto en la materia. A modo de guía, ver Protecting groups, Kocienski, 2004, 3rd edition.

Según la presente memoria, cualquiera de los compuestos definidos anteriormente, es decir, aquellos compuestos que responden a la fórmula general (I), pueden ser igualmente referidos en esta memoria como “compuesto o compuestos de la invención”.

Asimismo, hay que entender que la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I), es decir, todas las formas geométricas, tautoméricas y ópticas, y sus mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas). Cuando hay más centros quirales en los compuestos de fórmula (I), la presente invención incluye dentro de su alcance todos los posibles diastereómeros, incluidas sus mezclas. Las diferentes formas isómeras pueden separarse o resolverse entre sí por métodos convencionales, o cualquier isómero dado puede obtenerse por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica, estereoselectiva o asimétrica.

El término “tautómero” o “forma tautomérica”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles vía una barrera de baja energía. Por ejemplo, tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) que incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, como por ejemplo isomerizaciones ceto-enólicas o imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos electrones de enlace.

La presente invención también incluye compuestos marcados con isótopos, que son idénticos a los citados en las fórmula (I) salvo en que uno o más átomos se han reemplazado por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, yodo y cloro, tales como ^{2}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{123}I y ^{125}I.

En este sentido, dentro del alcance de la presente invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos. Los compuestos marcados con isótopos de la presente invención, por ejemplo aquéllos en que se incorporan isótopos radioactivos tales como ^{3}H o ^{14}C, son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Se prefieren particularmente los isótopos tritio, es decir ^{3}H, y carbono-14, es decir, ^{14}C, por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos ^{11}C y ^{18}F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones), y los isótopos ^{125}I son particularmente útiles en SPECT (tomografía computerizada de emisión de un solo fotón), todos útiles en la formación de imágenes del cerebro. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales

como deuterio, es decir, ^{2}H, puede proporcionar algunas ventajas terapéuticas que resultan de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor vida media *in vivo* o menores requisitos de dosificación, y por lo tanto en algunos casos pueden ser preferidos. Los compuestos isotópicamente marcados de fórmula (I) se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los siguientes ejemplos, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible.

Por otro lado, para uso farmacéutico, las sales mencionadas anteriormente serán sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas por Berge, Bighley y Monkhouse, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19. Así, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales preparadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N’-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen el ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilensalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico,

cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

Asimismo, los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, los solvatos son hidratos.

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales o solvatos están preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por “forma farmacéuticamente aceptable” se entiende, entre otros, que tienen un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I) o de sus sales, o solvatos.

En una realización preferida, el compuesto de formula general (**I**) se selecciona de la lista que comprende:

3'-(4-clorofenil)-5’-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5,5’-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2,6'-dioxo-5-nitro-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5’-fluoro-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
5-cloro-3'-(4-clorofenil)-5’-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5’,6-difluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-bromofenil)-5’-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo; y

3'-(4-bromofenil)-5’,6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida la composición farmacéutica comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o un gobierno federal, o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense, en la Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser empleados solos o junto con otros fármacos o principios activos para proporcionar una terapia combinada. Los otros fármacos o principios activos pueden formar parte de la misma composición farmacéutica, o ser proporcionados como una composición farmacéutica separada, para su administración al mismo tiempo o en un momento diferente. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

En una realización preferida, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de AMPK, y aún más

preferentemente para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes, neurológicas, síndrome metabólico y cáncer.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes de tipo 1 y 2, obesidad, inflamación, dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia, hipertriglicerimidemia, resistencia a la insulina, epilepsia y enfermedades de Krabbe/Twitcher, Alzhéimer, Parkinson y Huntington.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes de tipo 1 y tipo 2.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la epilepsia.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Krabbe/Twitcher.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que

contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades de Alzhéimer, Parkinson y Huntington.

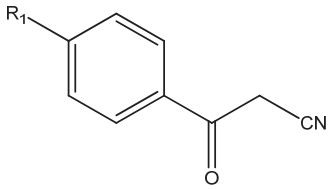
En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente, o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata y de mama.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno o enfermedad relacionadas con la activación de AMPK, preferentemente seleccionado entre el síndrome metabólico y las enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, neurológicas y el cáncer, y más preferentemente diabetes de tipo 1 y 2, hiperglucemia, obesidad, inflamación, epilepsia, cáncer de próstata, cáncer de mama y las enfermedades de Krabbe/Twitcher Alzhéimer, Parkinson y Huntington, que comprende administrar a un sujeto el compuesto de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, o una composición farmacéutica de la invención que comprenda el compuesto de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva.

La cantidad de compuesto de la invención, sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, terapéuticamente eficaz que debe administrarse (también referida en la presente descripción como cantidad terapéuticamente eficaz o efectiva), así como su dosificación para tratar un estado patológico con dichos compuestos, dependerá de numerosos factores, entre los que se encuentra la edad, el estado del paciente, la severidad de la enfermedad, la ruta y frecuencia de administración, el compuesto modulador a utilizar, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula general (I) que comprende los siguientes pasos:

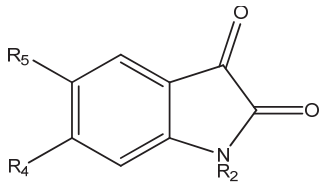
(a) reacción de condensación entre compuesto de fórmula (**II**) y un compuesto NH_2-NHR_3



II

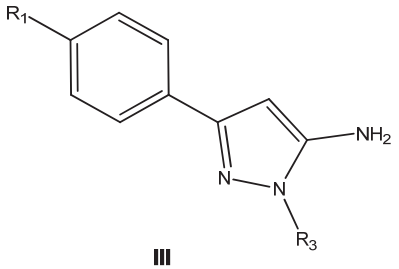
donde R_1 y R_3 están definidos anteriormente;

(b) reacción de condensación del compuesto de fórmula (**IV**)



IV

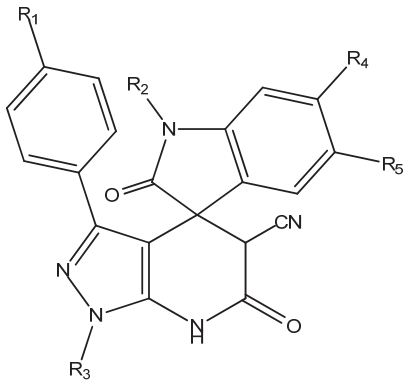
con el compuesto obtenido en el paso (a) de fórmula (**III**) durante 12-24 horas a 60-120ºC



III

donde R_1-R_5 están definidos anteriormente; y

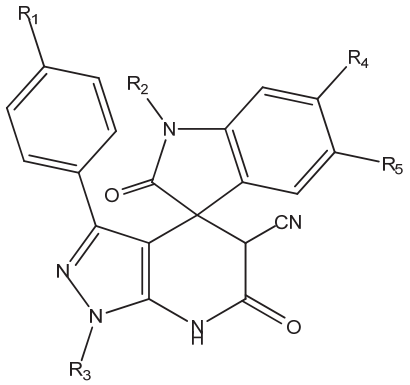
(c) reacción del compuesto obtenido en el paso (b) de fórmula (**Ia**) con un agente halogenante



Ia

donde R_1-R_5 están definidos anteriormente.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (**Ia**) o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables correspondientes



Ia

en la que R_1-R_5 están definidos anteriormente, con la condición de que cuando R_1 es hidrógeno R_4 no es hidrógeno.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Efecto de activación de AMPK del compuesto 1. Ejemplo del análisis de Western Blot que muestra que el compuesto 1 activa AMPK de una manera dosis dependiente. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 7,5 – 120 μM. Las células Hek293 son tratadas con 30 μg del compuesto 1 durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante Western Blot usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKb1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

FIG. 2. Efecto de activación de AMPK de los compuestos 11 y 13. Ejemplo del análisis de Western Blot que muestra que los compuestos 11 y 13 activan AMPK de una manera dosis dependiente. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 5 – 100 μM. Las células Hek293 son tratadas con 30 μg de los compuestos 11 y 13 durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante Western Blot usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKb1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

FIG. 3. Efecto de activación de AMPK del compuesto 12. Ejemplo del análisis de Western Blot que muestra que el compuesto 12 activa AMPK de una manera dosis dependiente. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 5 – 100 μM. Las células Hek293 son tratadas con 30 μg del compuesto 12 durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante Western Blot usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKb1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

FIG. 4. Efecto de activación de AMPK del compuesto 15. Ejemplo del análisis de Western Blot que muestra que el compuesto 15 activa AMPK de una manera dosis dependiente. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 5 – 50 µM. Las células Hek293 son tratadas con 30 µg del compuesto 15 durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante Western Blot usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKb1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

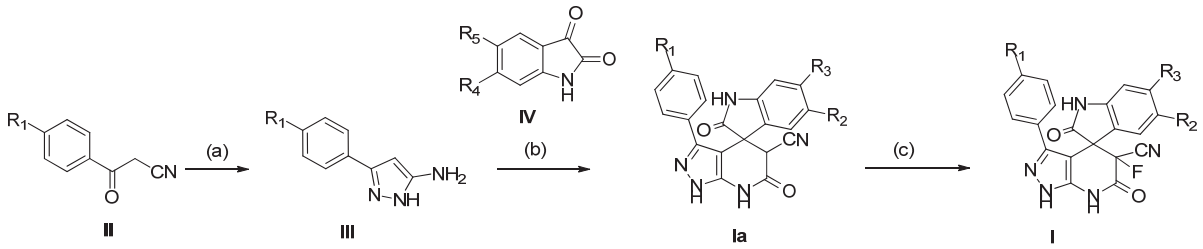
EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Procedimiento general de síntesis de los compuestos de fórmula general (I)

Los compuestos de fórmula general (I) fueron sintetizados de acuerdo con la ruta sintética que se recoge en el siguiente esquema de reacción:



a) Hidrazina (1eq.), EtOH, 12h; b) Cianoacetato de etilo (1 eq.), cat., agua, 90 ºC, 12h; c) Selectfluor (2 eq.), MeOH, 3h

Procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1*H*-pirazoles (III)

A una disolución del correspondiente benzoilacetonitrilo (100 mg, 1 eq.) en 10 mL de EtOH a reflujo se añade la correspondiente hidrazina (1,5 eq.). La mezcla se deja agitar a reflujo una noche. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a

presión reducida y el residuo seco se tritura en Et_2O, apareciendo un precipitado que se filtra, se lava con Et_2O frío y se deja secar al aire.

3-amino-5-(4-clorofenil)-1H-pirazol (III-1)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 150 mg (66 %) de un sólido blanco. **P.f.** 169 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 7,65 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2'), 7,40 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H3'), 5,73 (s, 1H, H4), 4,90 (s, 2H, NH_2). **HPLC:** t_R= 4,49 (99,9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 194,0 $[M+H]^+$.

3-amino-5-(4-bromofenil)-1H-pirazol (III-2)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 74 mg (71 %) de un sólido blanco. **P.f.** 160 – 162 ^oC **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 11,72 (s, 1H, NH), 7,55 (m, 4H, H-Ar), 5,73 (s, 1H, H4), 4,89 (s, 2H, NH_2). **HPLC:** t_R= 2,98 (99,9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 239,8 $[M]^+$.

Procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos (Ia)

Se suspende la correspondiente isatina (1 eq.) en agua (0,05 mL/mg) y a la mezcla se añade cianoacetato de etilo (1 eq.) y el catalizador indicado en cada caso, agitándose a 80 ^oC durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se añade el correspondiente 3-amino-5-fenil-pirazol (1 eq), y se agita una noche a 90 ^oC. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica según el procedimiento indicado en cada caso.

3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-1)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 340 mg de isatina, 581,94 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y trietilamina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a., apareciendo un precipitado marrón que se filtra y lava con agua y Et_2O, obteniéndose 666 mg (75 %) de un sólido marrón. **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,92 (s, 1H, NH), 12,79 (s, 1H, NH), 11,44 (s, 1H, NH), 11,19 (s, 1H, NH), 11,02 (s, 1H, NH), 10,95 (s, 1H, NH), 7,44 – 7,28 (m, 1H), 7,17 – 6,76 (m, 8H, H-Ar), 6,73 – 6,61 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,38 – 5,25 (s, 1H, H5'), 4,96 – 4,89 (s, 1H, H5'). **HPLC**

(H_2O 15 → 95 % MeCN, 0,2% HCOOH durante 10 min)**:** t_R= 7,44 (99,9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 390,4 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]pyridina]-5'-carbonitrilo (Ia-2)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg de 5-fluoroisatina, 234,53 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y ácido acético (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a. Se filtra el precipitado resultante, se lava con agua y se deja secar, obteniéndose 290 mg (58 %) de un sólido marrón. **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,97 (s, 1H), 12,84 (s, 1H), 11,45 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 11,06 (s, 1H), 11,00 (s, 1H), 7,68 – 6,85 (m, 9H, H-Ar), 5,38 (s, 1H, H5'), 4,97 (s, 1H, H5') **HPLC:** t_R= 3,80 (95 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 407,8 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-5-nitro-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-3)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg de 5-nitroisatina, 197,53 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y trietilamina (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina parte del disolvente a presión reducida hasta dejar un volumen aproximadamente igual a la mitad del inicial. Al enfriar a t.a., se observa la aparición de un precipitado que se filtra y lava con agua y DCM, obteniéndose 140 mg (31 %) de un sólido rojo. **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,05 (s, 1H), 12,91 (s, 1H), 11,76 (s, 1H), 11,67 (s, 1H), 11,60 (s, 1H), 11,33 (s, 1H), 8,34 – 6,81 (m, 9H), 5,62 (s, 1H, H5'), 5,11 (s, 1H, H5'). **HPLC:** t_R= 3,80 (97 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 435,4 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-4)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 35 mg de 5-fenilisatina, 30,36 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y ácido acético (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina parte del

disolvente a presión reducida hasta dejar un volumen aproximadamente igual a la mitad del inicial. Se deja enfriar a t.a y el sólido resultante se filtra y se lava con agua y DCM, obteniéndose 21 mg (25 %) de un sólido blanco. **Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,96 (s, 1H), 12,83 (s, 1H), 11,45 (s, 1H) 11,23 (s, 1H), 11,03 (s, 1H), 7,36 – 6,86 (m, 14H, H-Ar), 5,40 (s, 1H, H5'), 4,96 (s, 1H, H5'). **HPLC:** t_R= 4,36 (96%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 465,6 [M+H$^+$].

5-cloro-3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-5)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg de 5-cloroisatina, 213,27 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y ácido acético (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: hexano), obteniéndose 80 mg (17 %) de un sólido blanco. **Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 10,36 (s, 1H), 10,14 (s, 1H), 10,10 (s, 1H), 9,99 (s, 1H), 7,59 – 6,98 (m, 14H, H-Ar), 5,00 (s, 1H, H5'), 4,73 (s, 1H, H5'). **HPLC:** t_R= 3,98 (98 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 424,4 [M$^+$].

3'-(4-clorofenil)-6-fluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-6)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 90 mg de 6-fluoroisatina, 66,97 mg de 3-amino-5-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol y piperidina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: hexano), obteniéndose 50 mg (36 %) de un sólido blanco. **Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,95 (s, 1H), 12,83 (s, 1H), 11,47 (s, 1H), 11,23 (s, 1H), 11,20 (s, 1H), 11,13 (s, 1H), 7,45 – 6,48 (m, 14H, H-Ar), 5,39 (s, 1H, H5'), 4,95 (s, 1H, H5'). **HPLC:** t_R= 3,86 (96 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 408,3 [M+H$^+$].

3'-(4-bromofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-7)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg de isatina, 317 mg de 3-amino-5-(4-bromofenil)-1*H*-pirazol y piperidina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: hexano), obteniéndose 336 mg (57 %) de un sólido beige. **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,95 (s, 1H), 12,81 (s, 1H), 11,20 (s, 1H), 11,04 (s, 1H), 10,95 (s, 1H), 10,44 (s, 1H), 7,55 – 6,75 (m, 10H, H-Ar), 6,50 – 6,46 (t, *J* = 7,29 Hz, 4H), 5,34 (s, 1H, H5'), 4,92 (s, 1H, H5'). **HPLC** (H_2O 15 → 95 % MeCN, 0,2% HCOOH durante 10 min)**:** t_R= 7,44 (99,9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 390,0 [M+H$^+$].

3'-(4-bromofenil)-6-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Ia-8)

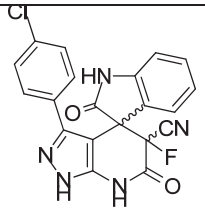
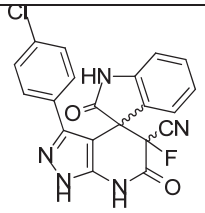
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 100 mg de 6-fluoroisatina, 144,19 mg de 3-amino-5-(4-bromofenil)-1*H*-pirazol y ácido acético (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a. Se filtra el precipitado marrón resultante, se lava con agua y se deja secar, obteniéndose 158 mg (58 %) de un sólido marrón. **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,97 (s, 1H), 12,84 (s, 1H), 11,45 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 11,06 (s, 1H), 11,00 (s, 1H), 7,68 – 6,85 (m, 9H), 5,38 (s, 1H, H5'), 4,97 (s, 1H, H5'). **HPLC:** t_R= 3,92 (98%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 454,1 [M+2H$^+$].

Procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos (I)

Se disuelven en un matraz el derivado de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilo correspondiente (1 eq.) y Selectfluor (2 eq.) en MeOH y se agita a reflujo durante 3 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se filtra sobre gel de sílice (DCM:MeOH 10:1) para eliminar los restos inorgánicos y el producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo realizados con una columna Sunfire C18 de tamaño de partícula 5 micras y de dimensiones 19x150 mm, usando el gradiente de elución indicado en cada caso.

3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 1 y 2)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg de **Ia-1** y 181,2 mg de Selectfluor, obteniéndose 60 mg (29 %) de un sólido blanco. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 31%-69%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

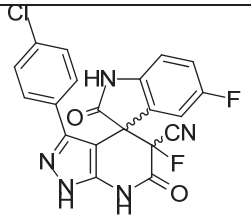
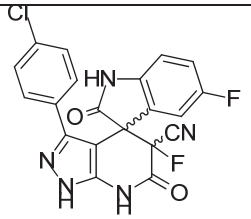
Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
1		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 408,2 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 38,62 (99,9%).
2		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 408,2 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69%, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 41,47 (99,9%).

1: Resultaron 12,5 mg (6 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 7,23 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H4), 7,12 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H3''), 6,93 (t, *J* = 7,70 Hz, 2H, H5, H6), 6,82 (d, *J* = 8,17 Hz, 2H, H2''), 6,70 (t, *J* = 7,63 Hz, 1H, H7). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 38,62 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 408,2 [M+H$^+$]. **2:** Resultaron 4 mg (2 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 7,26 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H4), 7,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3''), 6,98 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H6), 6,87 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, H2'', H5), 6,76 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, H7). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69%, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 41,47 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 408,2 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-5,5'-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 3 y 4)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg de **Ia-2** y 86,87 mg de Selectfluor, obteniéndose 40 mg (77 %) de un sirope marrón. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC

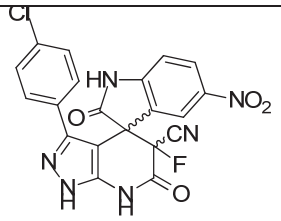
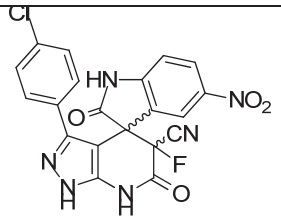
semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 31%-69%, 0,1% HCOOH durante 40 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
3		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 426,4 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 31,39 (99,9 %).
4		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 426,4 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 36,34 (99,9 %).

3: Pf. > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,94 (s, 1H, NH), 11,51 (s, 1H, NH), 7,20 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H3''), 7,12 (td, *J* = 9,1, 2,8 Hz, 1H, H7), 6,96 (dd, *J* = 8,7, 4,4 Hz, 1H, H4), 6,89 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H2''), 6,69 (dd, *J* = 8,2, 2,7 Hz, 1H, H6). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 31,39 (99,9 %). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 426,4 [M+H$^+$]. **4: Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,12 (s, 1H, NH), 11,98 (s, 1H, NH), 11,44 (s, 1H, NH), 7,24 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H3''), 7,14 (td, *J* = 8,5, 2,3 Hz, 1H, H7), 7,00 (dd, *J* = 8,6, 4,4 Hz, 1H, H4), 6,91 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H2''), 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H6). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 31-69 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 36,34 (99,9 %). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 426,4 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-5'-difluoro-5-nitro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 5 y 6)

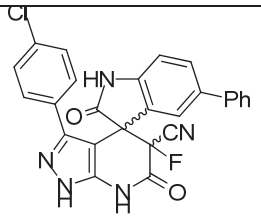
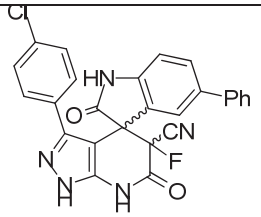
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg de **Ia-3** y 81,48 mg de Selectfluor, obteniéndose 40 mg (77 %) de un sirope naranja. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 33%-70%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
5		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 453,3 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 30-70 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 32,41 (99,9%).
6		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 453,3 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 30-70 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 36,74 (99,9%).

5: Resultaron 4 mg (8 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,22 (s, 1H, NH), 12,27 (s, 1H, NH), 8,24 (dd, *J* = 8,1, 1,5 Hz, 1H, H4), 7,54 (s, 1H, H1), 7,21 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3''), 7,05 (m, 1H, H7), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H2''), 6,55 (m, 1H, H6). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 30-70 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 32,41 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 453,3 [M+H$^+$]. **6:** Resultaron 2 mg (4 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,86 (s, 1H, NH), 11,65 (s, 1H, NH) 8,65 (dd, J = 8,1, 1,5 Hz, 1H, H4), 7,68 (s, 1H, H1), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H3''), 7,28 (m, 1H, H7), 6,83 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H2''), 6,77 (m, 1H, H6). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 30-70 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 36,74 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 453,3 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 7 y 8)

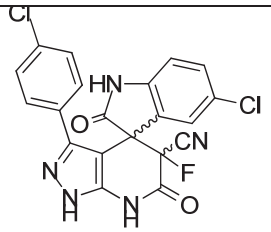
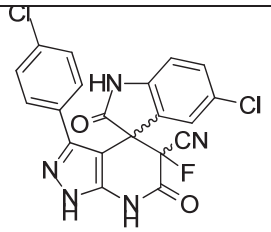
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg de **Ia-4** y 76,04 mg de Selectfluor, obteniéndose 50 mg (97 %) de un aceite naranja. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 40%-60%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
7		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 484,2 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 40-60 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 22,73 (99,9%).
8		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 484,2 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 40-60 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 25,31 (99,9%).

7: Resultaron 4 mg (8 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,21 (s, 1H, NH), 11,40 (s, 1H, NH), 7,47 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H4), 7,41 – 7,25 (m, 3H, H3'', H7), 7,08 (dd, *J* = 17,8, 8,8 Hz, 6H, Ph, H6), 6,88 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2''). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 40-60 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 22,73 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 484,2 [M+H$^+$]. **8:** Resultaron 2 mg (4 %). **Pf.** > 350 ^oC. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,65 (s, 1H, NH), 11,35 (s, 1H, NH), 7,88 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H4), 7,61 – 7,40 (m, 3H, H3'', H7), 7,12 (dd, *J* = 17,8, 8,8 Hz, 6H, Ph, H6), 6,69 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2''). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 40-60 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 25,31 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 484,2 [M+H$^+$].

5-cloro-3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 9 y 10)

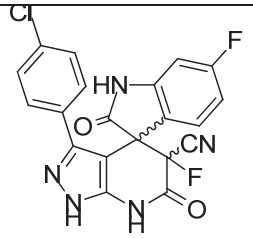
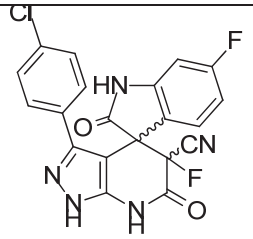
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 60 mg de **Ia-5** y 100,2 mg de Selectfluor, obteniéndose 60 mg (96 %) de un aceite naranja. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 36%-64%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
9		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 443,4 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 36-64 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 21,93 (99,9%).
10		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 443,4 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 36-64 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 25,42 (99,9%).

9: Resultaron 4 mg (6 %). **Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,24 (s, 1H, NH), 11,94 (s, 1H, NH), 11,38 (s, 1H, NH), 7,31 (dd, *J* = 8,4, 2,2 Hz, 1H, H6), 7,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3''), 6,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H7), 6,88 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H2''), 6,79 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H4). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 36-64 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 21,93 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 443,4 [M+H$^+$]. **10:** Resultaron 4 mg (6 %). **Pf.** > 350 °C. **^{1}H RMN** (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,16 (s, 1H, NH), 12,10 (s, 1H, NH), 11,57 (s, 1H, NH), 7,34 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H, H6), 7,25 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H7), 7,01 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3''), 6,90 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H2''), 6,81 (s, 1H, H4). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 36-64 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 25,42 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 443,4 [M+H$^+$].

3'-(4-clorofenil)-5',6-difluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 11 y 12)

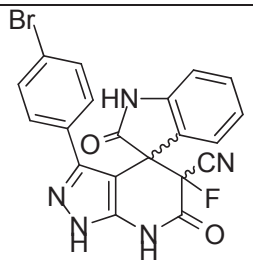
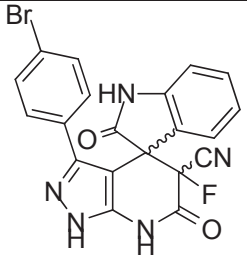
Se disuelven en un matraz **Ia-6** (50 mg, 0,123 mmol) y Selectfluor (86,87 mg, 0,246 mmol) en unos 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante 2 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano), obteniéndose 12 mg (23 %) de un sólido blanco. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 33%-67%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
11		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 425,6 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 38,27 (99,9%).
12		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 425,6 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 40,95 (99,9%).

11: Resultaron 7,8 mg (15 %). **Pf.** 270 ºC. **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,17 (s, 1H, NH), 11,92 (s, 1H, NH), 11,38 (s, 1H, NH), 7,21 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H3''), 6,93 (dd, *J* = 8,5, 5,3 Hz, 1H, H4), 6,87 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H2''), 6,81 (dd, *J* = 8,9, 2,4 Hz, 1H, H7), 6,60 – 6,50 (m, 1H, H5). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 38,27 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 425,6 [M+H$^+$]. **12:** Resultaron 4,0 mg (7 %). **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm):7,25 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H2''), 7,22 – 7,14 (m, 1H), 7,09 – 6,99 (m, 1H), 6,88 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H3''), 6,61 – 6,50 (m, 1H). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 40,95 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 425,6 [M+H$^+$].

3'-(4-bromofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 13 y 14)

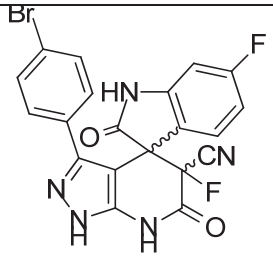
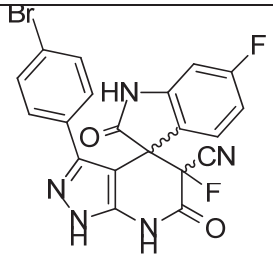
Se disuelven en un matraz **Ia-7** (100 mg, 0,230 mmol) y Selectfluor (81,58 mg, 0,238 mmol) en 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante 2 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: hexano), obteniéndose 20 mg (19 %) de un sólido beige. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 33-67%, 0,1% HCOOH durante 50 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
13		**MS** (ES, modo positivo): *m/z* 452,0 [M^+]. **14:** Resultaron 4,2 mg (4 %). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 31,50 (99,9%).
14		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 452,0 [M^+]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 33,18 (99,9%).

13: Resultaron 4,5 mg (4 %). **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 7,22 (m, 3H, H-Ar), 6,93 (m, 2H), 6,75 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H2''), 6,70 (dt, *J* = 7,6, 1,1 Hz, 1H, H5). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 31,50 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 452,0 [M^+]. **14:** Resultaron 4,2 mg (4 %). **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN**. (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 7,32 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H2''), 7,27 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,02 – 6,91 (m, 1H), 6,79 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H3''), 6,49 – 6,35 (m, 1H). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 33-67 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 33,18 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 452,0 [M^+].

3'-(4-bromofenil)-5',6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (Compuestos 15 y 16)

Se disuelven en un matraz esférico **Ia-8** (70 mg, 0,155 mmol) y Selectfluor (82,25 mg, 0,232 mmol) en unos 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante unas 4 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: hexano), obteniéndose 30 mg (41 %) de un sólido blanco. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O-MeCN 35%-40%, 0,1% HCOOH durante 60 min.

Compuesto	Estructura	MS (ES+) /HPLC
15		**MS** (ES, modo positivo): *m/z* 471,1 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 35-40 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R=30,7 (99,9%).
16		**MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 471,1 [M+H$^+$]. **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 35-40%, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 33,5 (99,9 %).

15: Resultaron 9,5 mg (13 %). **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 13,14 (s, 1H, NH), 11,85 (s, 1H, NH), 11,40 (s, 1H, NH), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3''), 6,91 (dd, *J* = 8,5, 5,3 Hz, 1H, H4), 6,85 – 6,74 (m, 3H, H2'', H7), 6,53 (ddd, *J* = 9,8, 8,4, 2,5 Hz, 1H, H5). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 35-40 %, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R=30,7 (99,9%). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 471,1 [M+H$^+$]. **16:** Resultó 1 mg (1 %). **Pf.** > 350 ºC. **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,49 – 7,07 (m, 4H), 7,06 – 6,66 (m, 3H). **HPLC** (Isocrático H_2O-MeCN 35-40%, 0,1% HCOOH durante 60 min)**:** t_R= 33,5 (99,9 %). **MS (ES+): MS** (ES, modo positivo): *m/z* 471,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 2

Medidas de la activación de AMPK en células en cultivo por los compuestos de fórmula general (I)

Línea celular y tratamientos. La línea celular utilizada para los tratamientos con los diferentes reactivos ensayados fue HEK293T (células embrionarias de riñón humano). Las células crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 25 mM de glucosa suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, 2 mM glutamina 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en una atmósfera húmeda a 37°C con un 5% de CO_2. Las células se sembraron en placas de 60 mm (p.60) para obtener un 70-80% de confluencia y se lavaron en tampón Krebs Ringer (KRB: NaCl 12,5 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KH_22PO_4 0,5 mM, KCl 3 mM, $NaHCO_3$ 2,5 mM, $MgSO_4$ 0,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, 95:5 O_2 /CO_2) a 37°C. A continuación, se trataron durante 1 h a 37°C en la estufa de cultivos, añadiendo a cada una de ellas las cantidades adecuadas de los compuestos de fórmula general (**I**) **1, 11, 12, 13, y 15**,

(stock 5 mM en DMSO) disueltos en KRB/25 mM glucosa para alcanzar las concentraciones finales indicadas en la Figuras. Como control de activación se usó fenformina 5 mM.

Ejemplo3

Obtención de extractos de células HEK293T

Tras los correspondientes tratamientos, se eliminó el sobrenadante y se congelaron rápidamente en N_2 líquido. Las placas fueron procesadas una por una, y mantenidas en hielo, añadiendo en primer lugar el tampón de lisis frío. La composición del tampón era la siguiente: Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 15 mM pH 8,0, NaF 50 mM, $Na_4P_2O_7$ 15 mM, sacarosa 0,6 M, 2-Mercaptoetanol 15 mM, una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y PMSF 1 mM. Las células se recogieron en tampón de lisis con la ayuda de un rascador y fueron lisadas pasándolas por jeringas de 24 Gx5/8” 4 veces cada muestra. Se reservó una pequeña cantidad para medir la cantidad de proteína mediante Bradford y al resto se le añadió tampón de carga para electroforesis y se hirvió durante 5 min, manteniéndose a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, con el Bio-Rad Bradford Protein Assay Reagent (BioRad).

Ejemplo4

Análisis de proteínas mediante Western Blot

Los extractos de proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 8 o del 10% de acrilamida y de 1,5 mm de grosor. Se cargaron 30 µg de proteína y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) durante 1,5 h a 100 V. El bloqueo se hizo con 5% de leche desnatada en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó incubando el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados a temperatura ambiente con TBS-T de 10 min cada uno, se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a HRP. Después de tres lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS-T, las membranas se revelaron con ECL plus (Pierce) y se procesaron con un equipo FUJI LAS 3000 (Fujifilm). Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-pAMPKαThr172, anti-AMPKβ1/β2, anti-ACC y anti-pACCser79 de la casa Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) diluidos 1/1000. El anticuerpo secundario goat anti-rabbit HRP de la casa Santa Cruz Technology a una dilución 1/5000 ó 1/10000. La detección de bandas con los

anticuerpos Anti-pAMPKαThr172 y anti-pACCser79 (sustrato de AMPK) respecto de sus controles de carga respectivos (anti- AMPKβ1/β2 y anti-ACC) se tomó como indicativo de activación de AMPK.

Ejemplo 6

Resultados. Descripción efecto dosis-respuesta de los compuestos de fórmula general (I)

El estado de activación del complejo AMPK se correlaciona con los niveles de la forma fosforilada de la subunidad catalítica AMPKα pT172. Como se observa en el primer panel de las Figuras 1-4, tanto el tratamiento de las células HEK293T con dosis crecientes de los compuestos **1, 11, 12, 13 y 15** aumentó los niveles endógenos de AMPKα pT172, siendo indicativo del aumento del estado de activación del complejo AMPK. La activación alcanzada en algunos casos fue similar a la que se consiguió con fenformina, un compuesto con reconocida capacidad activadora de AMPK.

El segundo panel muestra el análisis del nivel endógeno de AMPKβ1, que se incluyó como control de carga para demostrar que el aumento en los niveles de AMPKα pT172 no eran debidos a un aumento de los niveles totales del complejo enzimático.

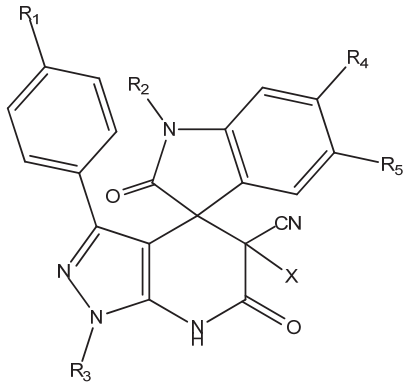
En el tercer panel se muestra el estado de fosforilación de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC), que es un sustrato de la proteína quinasa AMPK, por lo que un aumento de la actividad de AMPK incrementa el estado de fosforilación de este sustrato (ACC pS79). Como se observa, el estado de fosforilación de ACC aumenta de manera paralela a los niveles de AMPKα pT172.

El cuarto panel indica los niveles totales de ACC como control de carga, para validar que el cambio en los niveles de ACC pS79 son debidos a la fosforilación de la proteína y no a un aumento de los niveles totales de la misma.

Todos estos datos indican que los compuestos de fórmula general (I) **1, 11, 12, 13 y 15** son capaces de inducir *in vivo* la activación del complejo AMPK, a las dosis indicadas.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



(I)

o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que:

R_1 se selecciona entre hidrógeno, halógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, OR_a, SR_a, $COO(R_a)$, CF_3, $N(R_a)_2$, y un grupo arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido;

R_2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y COR_a;

R_3 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido;

R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido, halógeno, y grupo nitro;

X es un halógeno; y

R_a se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido.

2.- Compuesto según la reivindicación 1, donde X es flúor.

3.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_1 es cloro, bromo, o un grupo arilo (C_6-C_{18}) sustituido o no sustituido.

4.- Compuesto según la reivindicación 3, donde R_1 es cloro, bromo, o un grupo fenilo sustituido.

5.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_2 es

hidrógeno.

6.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_3 es hidrógeno, un grupo fenilo, o 4-metoxifenilo.

7.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_4 se selecciona de entre hidrógeno y flúor.

8.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_5 se selecciona de entre hidrógeno, flúor, un grupo nitro, y un grupo fenilo.

9.- Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de la lista que consiste en:
3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5,5'-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2,6'-dioxo-5-nitro-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
5-cloro-3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-clorofenil)-5',6-difluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo;
3'-(4-bromofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo; y
3'-(4-bromofenil)-5',6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo.

10.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11.- Uso de un compuesto de fórmula (I), o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables tal como se define en las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un medicamento.

12.- Uso de un compuesto de fórmula (I), o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables tal como se define en las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de AMPK.

13.- Uso según la reivindicación 12, donde las enfermedades se seleccionan de entre enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes, neurológicas, síndrome metabólico y cáncer.

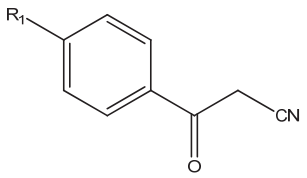
14.- Uso según la reivindicación 13, donde las enfermedades se seleccionan de entre diabetes de tipo 1 y tipo 2, obesidad, inflamación, dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia, hipertriglicerimidemia, resistencia a la insulina, epilepsia y las enfermedades de Krabbe/Twitcher, Alzhéimer, Parkinson y Huntington.

15.- Uso según la reivindicación 14, donde la enfermedad es diabetes de tipo 1, epilepsia, enfermedad de Krabbe/Twitcher, Alzheimer, Parkinson o Huntington.

16.- Uso según la reivindicación 13, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del cáncer de próstata y de mama.

17.- Procedimiento para la obtención del compuesto de fórmula general (I) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprenden los siguientes pasos:

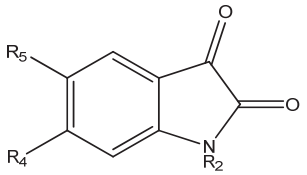
(a) reacción de condensación entre compuesto de fórmula (**II**) y un compuesto NH_2-NHR_3



II

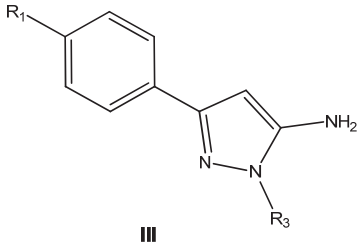
donde R_1 y R_3 están definida en la reivindicación 1;

(b) reacción de condensación del compuesto de fórmula (**IV**)



IV

con el compuesto obtenido en el paso (a) de fórmula (**III**)

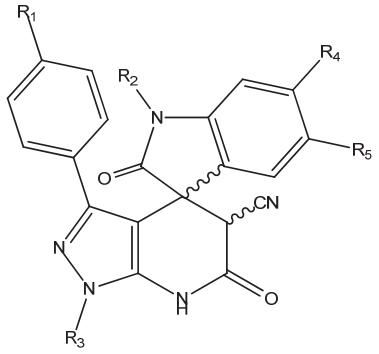


III

durante 12-24 horas a 60-120ºC;

donde R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 están definidos en la reivindicación 1; y

(c) reacción del compuesto obtenido en el paso (b) de fórmula (**Ia**)



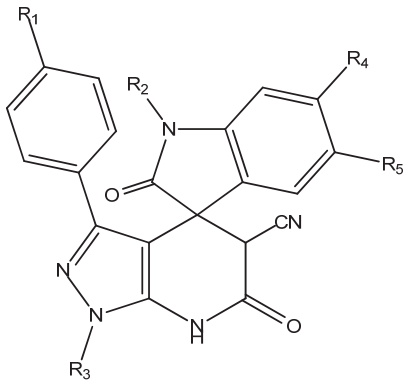
Ia

con un agente halogenante;

donde R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 están definidos en la reivindicación 1.

18.- Procedimiento según la reivindicación 17, donde el agente halogenante de la etapa (c) es selectfluor.

19.- Compuesto de fórmula (Ia)



Ia

o sus isómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que:

R_1 se selecciona entre hidrógeno, halógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, OR_a, SR_a, $COO(R_a)$, CF_3, $N(R_a)_2$, y un grupo arilo sustituido o no sustituido

R_2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y COR_a;

R_3 se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido;

R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, arilo, halógeno, y grupo nitro;

R_a se selecciona entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}) sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido;

con la condición de que cuando R_1 es hidrógeno, R_4 no es hidrógeno.

20.- Compuesto según la reivindicación 19, donde X es flúor.

21.- Compuesto según las reivindicaciones 19 y 20, donde R_1 es cloro, bromo, o un grupo arilo sustituido o no sustituido.

22.- Compuesto según la reivindicación 21, donde R_1 es cloro, bromo, o un grupo fenilo sustituido.

23.- Compuesto según las reivindicaciones 19 a 22, donde R_2 es hidrógeno.

24.- Compuesto según las reivindicaciones 19 a 23, donde R_3 es hidrógeno, un grupo fenilo, o 4-metoxifenilo.

25.- Compuesto según las reivindicaciones 19 a 24, donde R_4 se selecciona de entre hidrógeno y flúor.

26.- Compuesto según las reivindicaciones 19 a 25, donde R_5 se selecciona de entre hidrógeno, flúor, un grupo nitro, y un grupo fenilo.

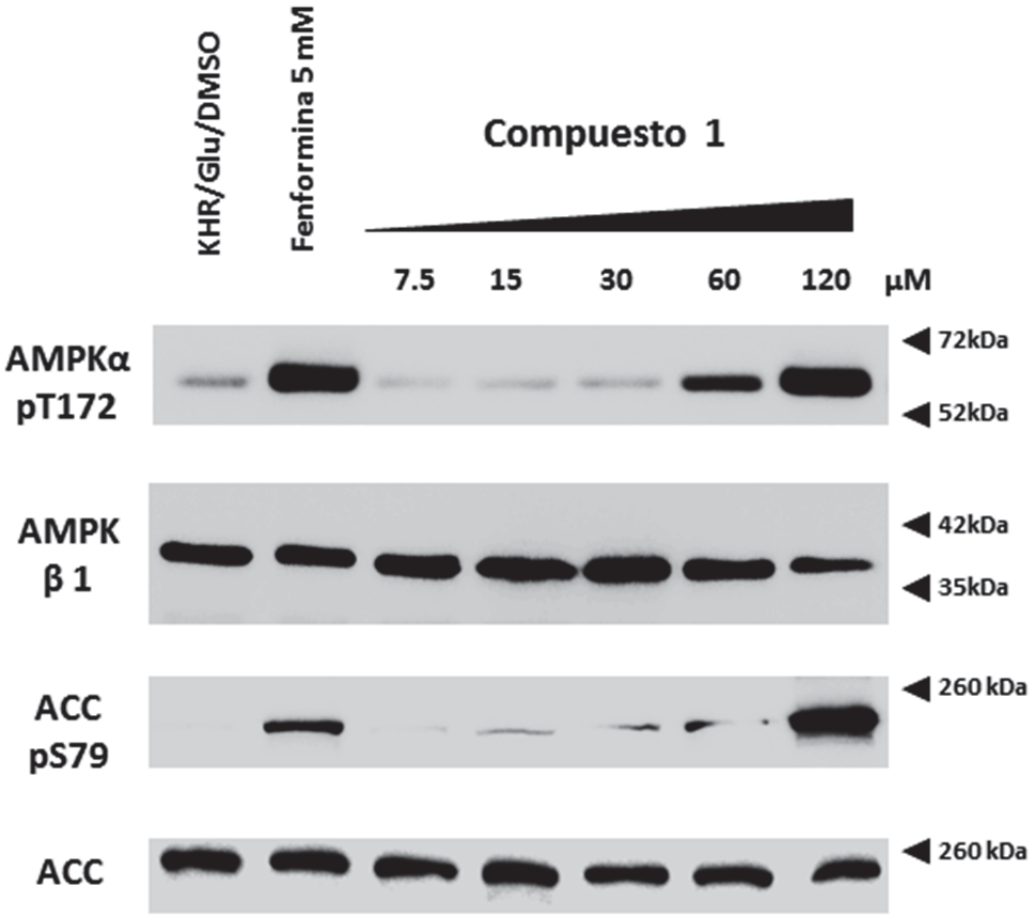

KHR/Glu/DMSO
Fenformina 5 mM
Compuesto 1
7.5
15
30
60
120
µM
AMPKα
pT172
72kDa
52kDa
AMPK
β 1
42kDa
35kDa
ACC
pS79
260 kDa
ACC
260 kDa

FIG. 1

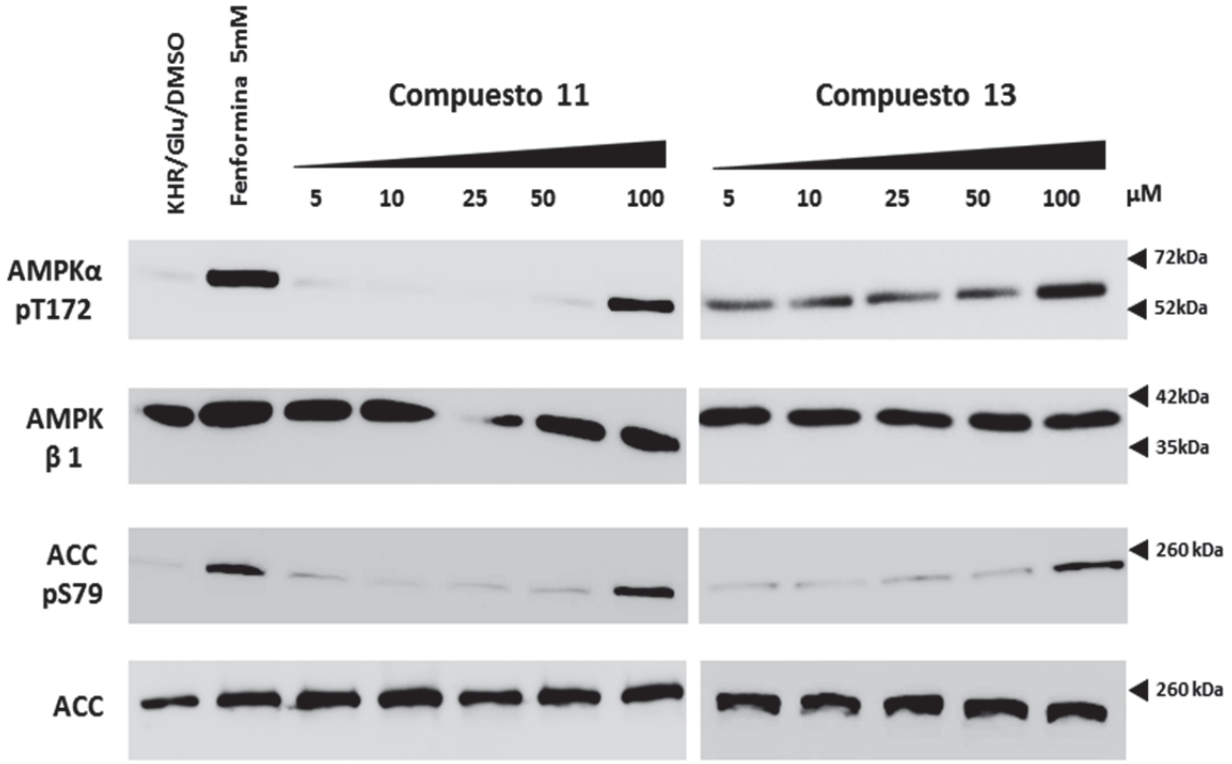

KHR/Glu/DMSO
Fenformina 5mM
Compuesto 11
Compuesto 13
5
10
25
50
100
5
10
25
50
100
µM
AMPKα
pT172
AMPK
β 1
ACC
pS79
ACC
72kDa
52kDa
42kDa
35kDa
260 kDa
260 kDa

FIG. 2

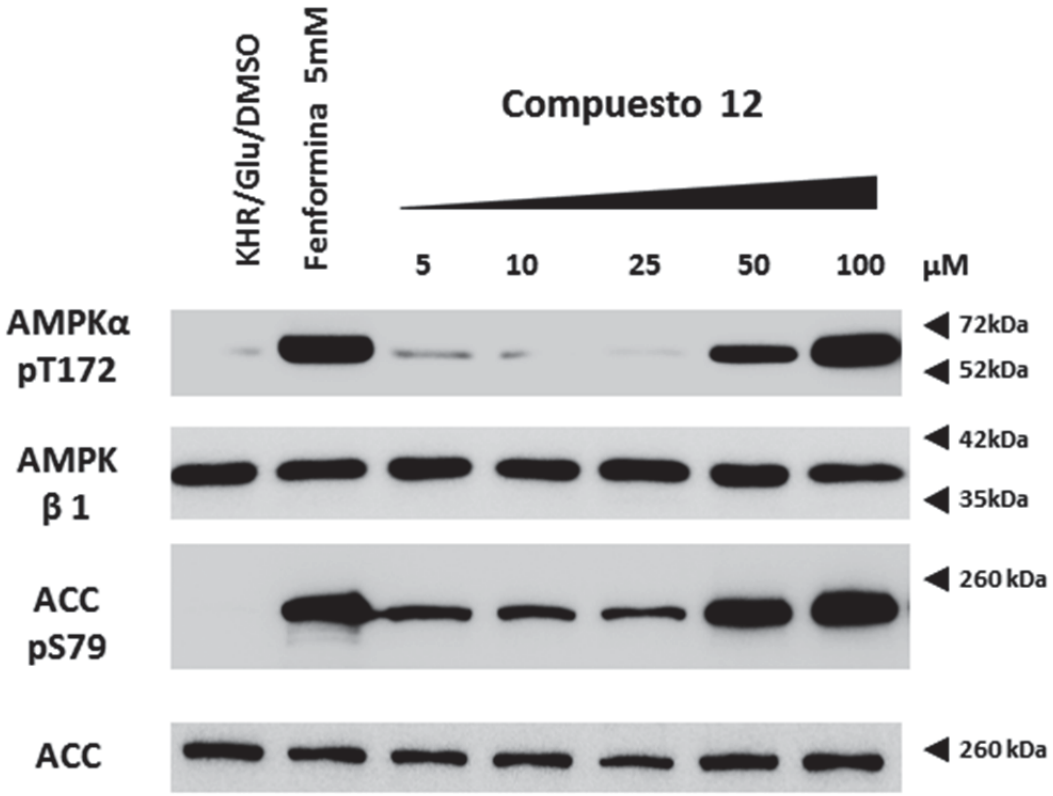

KHR/Glu/DMSO
Fenformina 5mM
Compuesto 12
5
10
25
50
100
µM
AMPKα
pT172
AMPK
β 1
ACC
pS79
ACC
72kDa
52kDa
42kDa
35kDa
260 kDa
260 kDa

FIG. 3

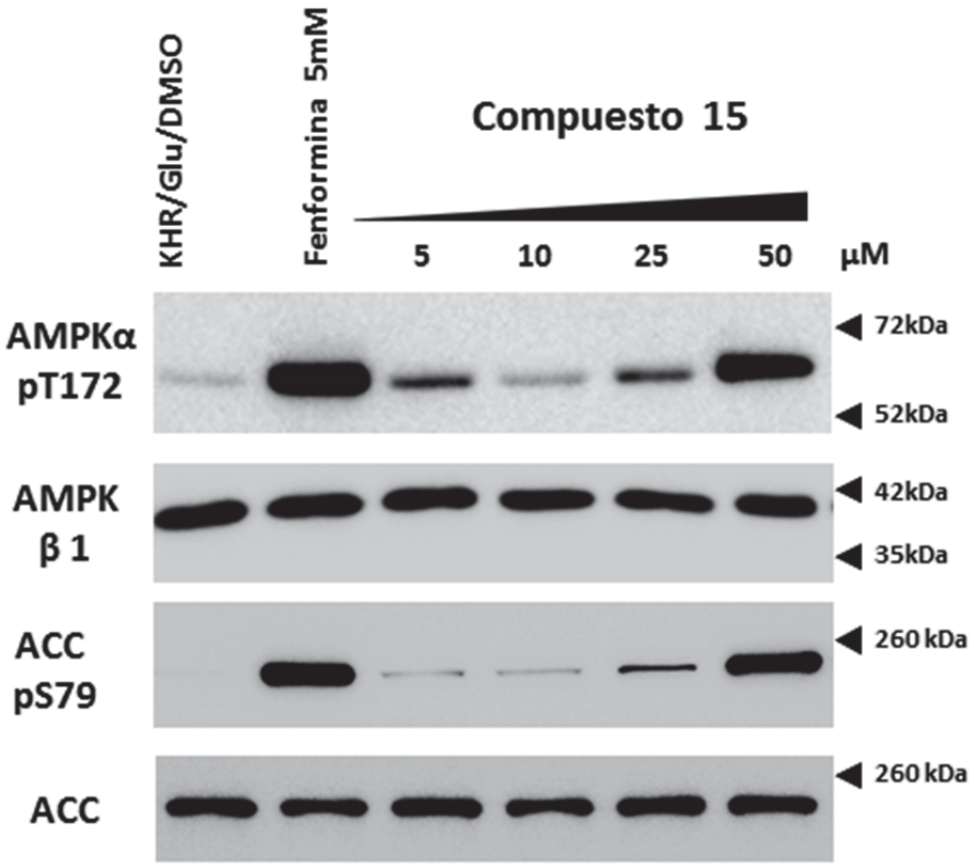

KHR/Glu/DMSO
Fenformina 5mM
Compuesto 15
5
10
25
50
µM
AMPKα
pT172
72kDa
52kDa
AMPK
β 1
42kDa
35kDa
ACC
pS79
260 kDa
ACC
260 kDa

FIG. 4