

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 790**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/06** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/US2014/064202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073281**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14802755 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 3068775**

54 Título: **Piperidil-etil-pirimidina sustituido como inhibidor de ghrelina O-acil transferasa**

30 Prioridad:

**14.11.2013 EP 13382460**

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

**26.12.2017**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ-GRAU, MARIA ANGELES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 647 790 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).

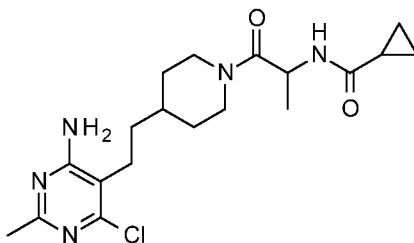
## DESCRIPCIÓN

Piperidil-etil-pirimidina sustituido como inhibidor de ghrelina O-acil transferasa

La presente invención se refiere a un compuesto útil para inhibir ghrelina O-acil transferasa (GOAT), composiciones farmacéuticas y compuestos para su uso en procedimientos para tratar enfermedades relacionadas con la actividad de GOAT.

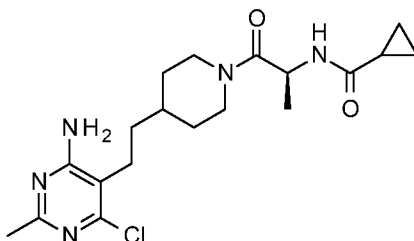
La GOAT pertenece a la familia de enzimas de O-acil transferasa unidas a la membrana (MBOAT). Esta convierte desacilghrelina (también conocida como ghrelina desacilada o UAG) en una forma biológicamente activa, acilghrelina (AG), mediante la transferencia de un ácido graso al residuo la Ser3 del péptido de desacilghrelina. La acilghrelina ha demostrado aumentar la ingesta de alimentos y disminuir la adiposidad en humanos y roedores. La inyección de AG en humanos también ha demostrado suprimir la secreción de insulina inducida por glucosa. La eliminación del gen de la ghrelina ha demostrado potenciar la liberación de insulina para evitar o mejorar la intolerancia a la lactosa en ratones ob/ob con una dieta alta en grasa.

La prevalencia de obesidad y diabetes acompañada de la efectividad variable y respuestas a tratamientos actuales para la obesidad y diabetes hace necesario que existan más opciones de tratamiento para los pacientes. Se cree que un inhibidor de la GOAT es un agente útil en el tratamiento de la obesidad. Se cree además que un inhibidor de la GOAT también es útil en la reducción del aumento de peso o en la recuperación de peso como un complemento a una dieta y/o ejercicio, otros agentes medicinales terapéuticos o procedimientos diseñados para reducir el aumento de peso o tratar la obesidad. De forma análoga, un inhibidor de la GOAT puede ser útil en el tratamiento de la diabetes del tipo 2, solo o en combinación con otros tratamientos para la diabetes del tipo 2. El documento WO2007079239 desvela compuestos de nitrógeno bicíclico como moduladores del receptor de la ghrelina. La presente invención proporciona un compuesto que es un inhibidor de la GOAT. En particular, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto que es un inhibidor de la GOAT de fórmula



La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes o excipientes. En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y uno o más otros agentes terapéuticos.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona compuestos para su uso en un procedimiento de reducción del aumento de peso o recuperación de peso o tratamiento de la diabetes de tipo 2 u obesidad que comprende la administración de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que lo necesita.

La presente invención además proporciona un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia, en particular para reducir el aumento de peso o recuperación de peso o tratamiento de la diabetes del tipo 2 u obesidad. Por otro lado, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para la reducción del aumento de peso o recuperación de peso o tratamiento de la diabetes del tipo 2 u obesidad.

El compuesto de la presente invención es generalmente eficaz sobre un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día se encuentran comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0,03 a

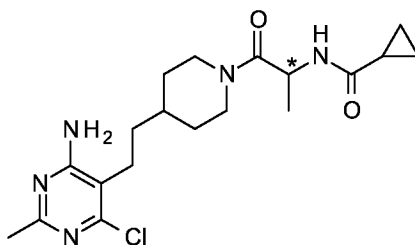
aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite del intervalo anteriormente mencionado pueden ser más adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún más grandes mientras que se mantiene un perfil de beneficio/riesgo favorable, y por lo tanto, el intervalo anterior no está concebido para limitar el ámbito de la invención de ningún modo. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente se determinará por un médico, a la vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se va a tratar, la ruta de administración seleccionada, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, así como la gravedad de los síntomas del paciente.

El término "tratando" (o "trato" o "tratamiento") tal como se usa en el presente documento se refiere a la contención, ralentización, detención o inversión de la progresión o gravedad de un síntoma existente, afección o trastorno.

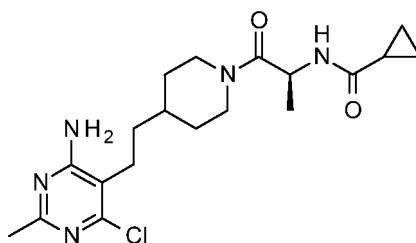
Tal como se usa en el presente documento, el término "reducción del aumento de peso" se refiere a la disminución del aumento de peso de un paciente. El término "reducción de la recuperación de peso" se refiere a la disminución del aumento de peso de un paciente que experimenta un rebote de peso después de una pérdida de peso. La recuperación de peso puede deberse a un efecto reborde seguido del cese de pérdida de peso logrado a través de una dieta, ejercicio, modificación de comportamiento o terapias aprobadas. Para que no haya dudas, aumento de peso o recuperación de peso tal como se usa en el presente documento, se refiere al aumento de peso o recuperación de peso inducido por la ingesta de comida o hábitos de alimentación y no hace referencia al aumento de peso no relacionado con la comida tal como la acumulación de líquidos, peso debido a la retención de agua, masa muscular o inflamación.

Un compuesto de la presente invención puede reaccionar para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, P. Stahl, y col. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2ª Edición Revisada (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, n.º 1, enero de 1977.

El experto en la materia apreciará que el compuesto de la invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, están comprendidos de un núcleo que contiene al menos un centro quiral:

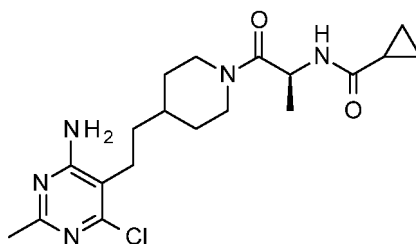


Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos que incluyen racematos, el compuesto preferente de la invención se representa mediante la fórmula:



o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Un compuesto de la presente invención se formula preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante una variedad de rutas. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, y col., eds., 21ª ed., Mack Publishing Co., 2005). Se prefiere más particularmente, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención representado mediante la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

5 Se pueden preparar enantiómeros o diastereómeros únicos empezando con reactivos quirales o mediante técnicas sintéticas estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, Los enantiómeros o diastereómeros únicos pueden aislarse de mezclas mediante técnicas cromatográficas o de cristalización quiral estándares en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la invención. Los enantiómeros o diastereómeros únicos de compuestos de la invención son una realización preferente de la invención.

10 Se conoce bien en la técnica que los agentes para el tratamiento de diabetes y/o obesidad pueden combinarse con otros agentes para el tratamiento de diabetes y/o obesidad. El compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede coadministrarse, simultánea o secuencialmente, con otro(s) tratamiento(s) efectivo(s) para la diabetes u obesidad. El compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse solo o en combinación con otro(s) tratamiento(s) efectivo(s), simultánea o secuencialmente, seguido de procedimiento médicos aprobados tales como cirugías bariátricas, por ejemplo, cirugía de bypass gástrico o procedimientos de banda gástrica ajustable.

15 La presente invención también abarca todos los procedimientos para la síntesis del compuesto de la presente invención.

20 Adicionalmente, los intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener una cantidad de grupos de protección de nitrógeno. El grupo de protección variable puede ser el mismo o distinto en cada aparición dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto en la materia. Véase, *por ejemplo*, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, (T. Greene and P. Wuts, eds., 2a ed. 1991).

### Preparaciones y Ejemplos

25 Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica del compuesto de la invención. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles o pueden sintetizarse fácilmente por un experto habitual en la materia. Debe entenderse que las preparaciones y los ejemplos se presentan a continuación con fines ilustrativos y no limitativos, y que pueden realizarse diversas modificaciones por un experto habitual en la materia.

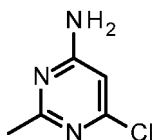
30 La configuración R o S del compuesto de la invención puede determinarse mediante técnicas estándar tales como análisis por rayos X y correlación con el tiempo de retención de HPLC quiral. Los nombres de las siguientes preparaciones y ejemplos se realizan usando la característica de nombre de IUPAC en MDL Accelrys® Draw version 4.0.NET.

35 Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se indican: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIPEA" se refiere a *N,N*-diisopropiletilamina; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HRP" se refiere a peroxidasa de rábano picante; "IC50" se refiere a la concentración de un agente que produce un 50 % de la respuesta máxima; "IPA" se refiere a alcohol de isopropilo; "MeOH" se refiere a metanol; "MTBE" se refiere a éter de metil *terc-butilo*; "PBS" se refiere a tampón fosfato salino; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "TEA" se refiere a trietilamina; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "T<sub>R</sub>" se refiere al tiempo de retención; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; y "TMB" se refiere a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

40 Condiciones LC-MS (pH bajo): columna: Phenomenex Gemini NX C18 2,1 x 50 mm 3,0 m; gradiente: 5-100 % B en 3 min, a continuación 100 % B para 0,75 min temperatura de columna: 50 °C +/-10 °C; caudal: 1 ml/min; Disolvente A: agua desionizada con 0,1 % de ácido fórmico; Disolvente B: ACN con 0,1% de ácido fórmico.

### 45 Preparación 1

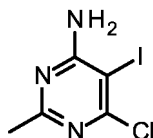
6-Cloro-2-metilpirimidina-4-amina



- 5 Se carga un recipiente a presión de metal de 5 L (autoclave) con 4,6-dicloro-2-metilpirimidina (400 g, 2,45 mol) e hidróxido de amonio (2,8 l) a TA. Se calienta la reacción a 90 °C durante 5 h. Se enfría la mezcla de reacción a TA y a continuación se filtra el sólido a través de un embudo de Büchner. Se limpia la torta de filtración con agua (200 ml) y hexano (200 ml) y a continuación se seca al vacío para conseguir el compuesto del título como un sólido de color blanco (290 g, 82 %). LC-ES/MS  $m/z$  144.0 (M+1).

### Preparación 2

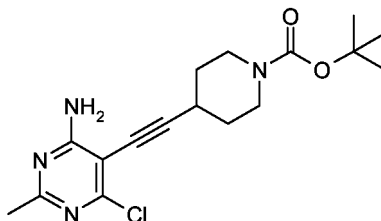
6-Cloro-5-iodo-2-metilpirimidina-4-amina



- 10 Se combina 6-cloro-2-metilpirimidin-4-amina (708 g, 4,93 mol) y MeOH (7,08 l) en un matraz de fondo redondo de 20 l equipado con un agitador mecánico. Se enfría a 0-5 °C. Se añade monoclóruo de yodo (4,806 kg, 29,6 mol) disuelto en MeOH (6 l) usando un embudo de adición durante un periodo de 1 h. Se calienta la mezcla de reacción a TA y se agita a TA durante 16 h. Se enfría la mezcla de reacción a 0-5 °C y se añade sulfito de sodio (46 l, 20 % de solución acuosa). Se filtra el sólido resultante y se lava con agua (2 l) seguido por hexano (3 l). Se seca el sólido al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (1061 g, 80 %). LC-ES/MS  $m/z$  269,9 (M+1).

### Preparación 3

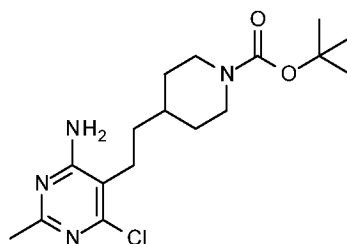
*terc-Butil* 4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato



- 20 Se disuelve 6-cloro-5-iodo-2-metil-pirimidin-4-amina (20 g, 74,22 mmol), 4-etil-piperidina-1-ácido carboxílico *terc*-butil éster (18,64 g, 89,06 mmol), y diisopropilamina (10,44 ml, 74,22 mmol) en THF (200 ml) en un matraz de 3 bocas. Se evacúa y carga de forma alternativa el matraz con nitrógeno 3 veces. Se añade bis(trifenilfosfina)paladio(II) cloruro (2,63 g, 3,71 mmol) y cobre(I) yodo (0,713 g, 3,71 mmol) a la solución. Se calienta la mezcla a entre 50 a 55 °C durante 16 h. Se enfría la mezcla a TA y se añade más
- 25 *bis*(trifenilfosfina)paladio(II) cloruro (1,31 g, 1,86 mmol), cobre(I) yodo (0,356 g, 1,86 mmol) y 4-etil-piperidina-1-ácido carboxílico *terc-butyl* éster (1,55 g, 7,42 mmol). Se calienta la mezcla a 60 °C durante 3,5 h. Se enfría la mezcla a TA y se concentra a presión reducida. Se diluye el material con DCM (300 ml) y se lava con solución de cloruro de amonio acuoso saturado (100 ml), agua (100 ml) y cloruro de sodio acuoso saturado (100 ml). Se seca la solución sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo usando cromatografía sobre gel de sílice (800 g de columna de gel de sílice) eluyendo con del 20 % al 100% de EtOAc en hexanos. Se concentran las
- 30 fracciones purificadas para proporcionar el compuesto del título como un polvo de color naranja pálido (22,6 g, 86 %). LC-ES/MS  $m/z$  (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 351,2/353,1 (M+1).

### Preparación 4

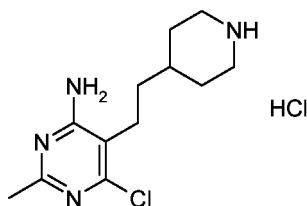
*terc-Butil* 4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato



Se combina *tert*-butil 4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato (4,30 g, 12,26 mmol) y platino(IV) óxido (0,139 g, 0,61 mmol) en EtOH (81 ml) y EtOAc (40 ml). Se evacúa y carga de forma alternativa el matraz con hidrógeno usando un balón de hidrógeno y se agita a TA durante 8 h. Se controla la reacción cuidadosamente para evitar un producto derivado potencial que resulta de la retirada del cloruro en la molécula. Cabe destacar que el producto es más soluble en la mezcla de disolvente que el alquino de partida. Se filtra la mezcla a través de tierra de diatomeas, aclarando con MeOH. Se concentra la solución a presión reducida. Se añade en un matraz sílice, 1-propanetiol (4 g, carga = 1,28 mmol/g, SILIABOND® Thiol de SILICYCLE®) (para retirar el paladio residual de la anterior reacción de acoplamiento) y EtOAc (300 ml). Se agita el material a TA 3 días. Se filtran los sólidos y se concentra el filtrado a presión reducida. Se repite la hidrogenación sobre el residuo resultante como sigue. Se carga el matraz que contiene el residuo con platino(IV) óxido (0,139 g, 0,61 mmol), EtOH (81 ml) y EtOAc (40 ml). De forma alternativa se evacúa y carga el matraz con hidrógeno usando un balón de hidrógeno y se agita a TA durante 8 h. Se filtra a través de tierra de diatomeas, aclarando con MeOH y se concentra el filtrado a presión reducida. Se repite la hidrogenación sobre el residuo resultante como sigue. Se carga el matraz que contiene el residuo con platino(IV) óxido (0,139 g, 0,61 mmol), EtOH (81 ml) y EtOAc (40 ml). De forma alternativa se evacúa y carga el matraz con hidrógeno usando un balón de hidrógeno y se agita a TA durante 8 h. Se filtra a través de tierra de diatomeas, aclarando con MeOH. Se concentra el filtrado a presión reducida sobre gel de sílice (20 g). Se purifica el material usando cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 70 % a 100 % de EtOAc en hexanos (120 g de columna). Se combinan las fracciones purificadas y se concentran a presión reducida. Se diluye el residuo con DCM y hexanos y se concentra a presión reducida tres veces. Se coloca el material al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (3,20 g, 73 %). LC-ES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 355,2/357,2 (M+1).

### Preparación 5

6-Cloro-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidina-4-amina, sal de hidrocioruro

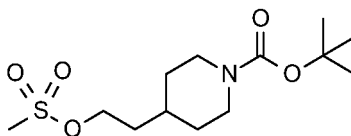


Se disuelve *tert*-butil 4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato (29,00 g, 81,72 mmol) en 1,4-dioxano (145 ml) y se añaden 4M de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (204,2 ml, 817,1 mmol). Se agita durante 18 h a TA. Se concentra la mezcla a presión reducida, se suspende en éter de dietilo (250 ml), se filtra y seca el sólido resultante al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco crudo (29 g). LC-ES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 255,2/257,2 (M+1).

**Ruta alternativa para 6-cloro-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidina-4-amina (Preparaciones 6-10)**

### Preparación 6

*tert*-Butil 4-(2-metilsulfoniloetil)piperidina-1-carboxilato

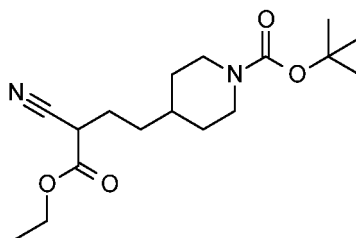


Se combina *tert*-butil 4-(2-hidroxietil)piperidina-1-carboxilato (4,720 kg, 20,6 mol) con DCM (40 l) y TEA (3020 ml, 21,63 mol) en un reactor de 50 l con una atmósfera de nitrógeno. Se enfría la solución a aproximadamente 0 °C y se añade lentamente cloruro de metil sulfonilo (2,478 kg, 21,63 mol) en DCM (5 l) mientras que se mantiene la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. Después de que se haya completado la adición agitar la mezcla durante 18 h a 15 °C en el momento en que TLC (1:1, hexano:EtOAc) no muestra material de partida restante. Se lava la mezcla con agua (30 l) y se dejan que las fases se separen. Se concentra la fase orgánica a un sólido. Se

suspende el sólido en MTBE (6 l), se recoge mediante filtración y se seca en un horno al vacío a 50 °C para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (5,67 kg, 91 %).

### Preparación 7

*tert*-Butil 4-(3-ciano-4-etoxi-4-oxo-butil)piperidina-1-carboxilato



5

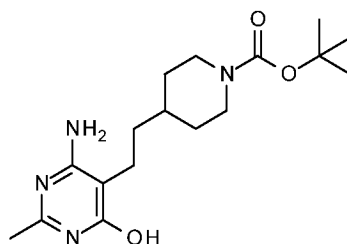
Se combina *tert*-butil 4-(2-metilsulfoniloxietil)piperidina-1-carboxilato (5,26 kg, 17,1 mol), etil cianoacetato (7 kg, 62 mol), 21 % de etóxido de sodio en EtOH (8,25 l, 24,75 mol) y EtOH (35 l) en un reactor de 50 l con una atmósfera de nitrógeno. Se calienta la mezcla a 35 - 40 °C durante 18 h en el momento que el análisis RMN muestra el 20 % del mesilato restante. Se continúa calentando la mezcla a 35 - 40 °C durante 24 h en el momento en que el análisis RMN muestra solo una pequeña cantidad de mesilato. Se enfría lentamente la reacción a TA y se añade ácido acético glacial (1422 ml, 22,68 mol) durante 30 min. Se concentra la mezcla usando destilación al vacío y a continuación partición entre agua (25 l) y EtOAc (35 l). Se separan las capas y se lava la fase acuosa con EtOAc (10 l). Se combinan las porciones orgánicas, se lava con salmuera (15 l) y se concentra en un aceite de color rojo. Se purifica el aceite usando cromatografía sobre gel de sílice (75 kg de gel de sílice, 65-250 de malla), eluyendo con hexano (40 l) y a continuación 20 % de EtOAc/hexano para proporcionar una fracción (7,8 kg) es decir, 30 % de etil cianoacetato/70 % del producto deseado. Se concentra el material mediante destilación de lámina enjuagada a 100 °C y 210 mtorr al vacío, se recoge la fracción no volátil para proporcionar el compuesto del título (4,54 kg, 82 %).

10

15

### Preparación 8

*tert*-Butil 4-[2-(4-amino-6-hidroxi-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato



20

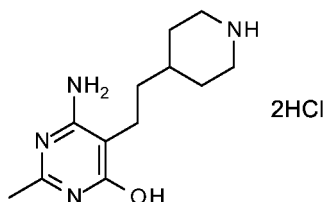
Se combina *tert*-butil 4-(3-ciano-4-etoxi-4-oxo-butil)piperidina-1-carboxilato (2,18 kg, 6,73 mol), hidrocloreto de acetamida (1,27 kg, 13,46 mol, 95 % de ensayo) [Nota: se seca previamente el hidrocloreto de acetamida mediante la suspensión por dos en tolueno (10 l) y a continuación extrayendo hasta la desecación al vacío], 21 % de etóxido de sodio en EtOH (6,73 l, 20,19 mol) y EtOH (10 l) en un reactor de 22 l con una atmósfera de nitrógeno. Se calienta la reacción a reflujo durante 42 h. Se ajusta la reacción a aproximadamente un pH = 5 con ácido acético glacial (1,2 l, 20,86 mol). Se retira el EtOH mediante destilación al vacío sobre un evaporador rotatorio. Se suspenden los sólidos resultantes en agua (6 l) y a continuación se recogen los sólidos mediante filtración, se lavan con agua adicional (2 l). Se secan los sólidos en un horno al vacío a 50 °C para proporcionar el compuesto del título (1,72 kg, 76 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,83 (s, 3H); 4,05 (d, 2H), 2,75 (bs, 2H), 2,39 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 1,78 (d, 2H), 1,43 (m, 1H) 1,42 (s, 9H), 1,40 (m, 2H), 1,38 (m, 2H). Se repite el procedimiento, esencialmente como se describe, usando *tert*-butil 4-(3-ciano-4-etoxi-4-oxo-butil)piperidina-1-carboxilato (2,36 kg) para obtener el compuesto del título (2,01 kg, 82 %).

25

30

### Preparación 9

6-Amino-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidin-4-ol, sal de dihidrocloruro

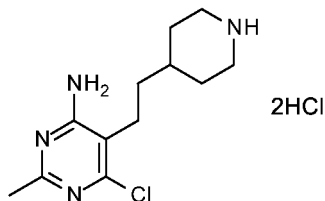


35

Se combina *tert*-butil 4-[2-(4-amino-6-hidroxi-2-metil-pirimidin-5-il)etil]piperidina-1-carboxilato (3,73 kg, 11,09 mol) y IPA en un reactor de 50 l con una atmósfera de nitrógeno. Se añaden 12 N de ácido clorhídrico (3,05 l, 36,6 mol) con agitación durante 3 h. Se calienta la mezcla a 50 °C durante 16 h, formando una suspensión espesa. En ese momento el análisis RMN no muestran ningún resto de grupo BOC. Se enfría la mezcla de reacción a 20 - 25 °C, diluyéndose con THF (12 l). Se recogen los sólidos mediante filtración. La filtración es lenta y puede llevar sobre 24 h para completarse. Se limpia con IPA (2 x 10 l). Se seca el material en un horno al vacío a 50 °C para proporcionar el compuesto del título (3,117 kg, 91 %).

### Preparación 10

6-Cloro-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidina-4-amina, sal de dihidrocloruro

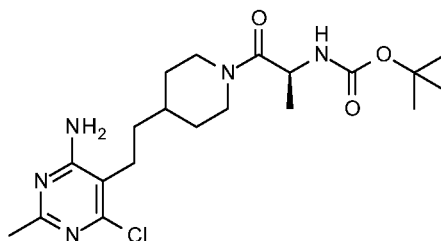


Se combina 6-amino-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidin-4-ol, sal de hidrocloreto (3,167 kg, 10,2 mol) y oxicleto de fósforo (30 l, 300 mol) con una atmósfera de nitrógeno en un reactor de 50 l que se ventila a través de un lavador cáustico (10 % de NaOH). Se añade un 85 % de ácido fosfórico (1 l, 8,5 mol) a la suspensión agitada. Se calienta la mezcla lentamente usando una temperatura de camisa de reactor de 75 °C. A aproximadamente 55 °C, cuando se produce el lavado, se enfría el lavador en un baño de hielo de agua. Cuando se ralentiza la liberación de gases, se calienta la mezcla a 90 - 95 °C durante 50 h en el momento en el que el análisis TLC y RMN muestra que la reacción está completa. Se retira la masa del exceso de oxicleto de fósforo mediante destilación al vacío (22 en Hg al vacío y 60 °C a temperatura interna) para recuperar 20 l en el destilado. Se enfría la mezcla a 20 - 25 °C y a continuación se diluye con tolueno (10 l). Se enfría adicionalmente la mezcla a < 15 °C y se inactiva lentamente con agua (1 l) manteniendo la temperatura < 30 °C. Después de la adición de tolueno la mezcla se vuelve muy espesa y complicada de agitar con la fase de producto permaneciendo al fondo del reactor como un semisólido viscoso. Se elevan las hojas del agitador para no conseguir ninguna mezcla. Se añade EtOH (10 l) a la mezcla y se agitan durante aproximadamente 18 h a 25 °C. En este punto, los semisólidos viscosos aún no se digieren completamente, pero se ablandan de modo que pueden analizarse manualmente. Se agita vigorosamente por otras 4 - 5 h para completar la digestión. Se enfría la suspensión resultante a 5 - 10 °C y se recogen los sólidos mediante filtración, lavando con MTBE (8 l) para obtener un producto húmedo (aproximadamente 6 kg).

Se recristaliza el producto en crudo resolviendo la torta húmeda en MeOH (35 l) a 40 °C. Se concentra la solución mediante destilación al vacío, retirando 15 l de disolvente. Se añade IPA (35 l) y se concentra la suspensión mediante destilación al vacío para retirar 13 l de disolvente. Se enfría la suspensión a 5 - 10 °C y a continuación se filtran los sólidos, limpiando con IPA (2 l) y a continuación MTBE (8 l). Se secan los sólidos en un horno al vacío a 55 °C para conseguir el compuesto del título como un sólido de color blanqueado (2,77 kg, 82 %). Calculado analítico para C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: C, 43,98; H, 6,46; Cl, 32,46; N, 17,10. Encontrado: C, 43,63; H, 6,53; Cl, 32,16; N, 16,86.

### Preparación 11

*tert*-Butil N-[(1S)-2-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxo-etil] carbamato



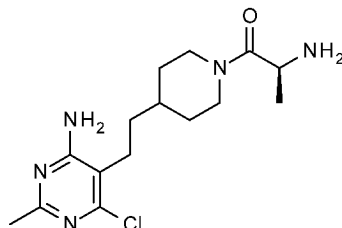
Se añaden en cada uno de dos matraces de fondo redondo 6-cloro-2-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]pirimidin-4-amina hidrocloreto (12,50 g, 42,92 mmol), diisopropiletilamina (22,46 ml, 128,7 mmol) y DMF (100 ml). Se enfría las dos mezclas en un baño de agua fría y se agitan durante 5 min. Se añade a cada una de las mezclas [dimetilamino(triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metileno]-dimetil-amonio hexafluorofosfato (17,95 g, 47,21 mmol) y (2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)ácido propanoico (8,93 g, 47,21 mmol) en una porción. Se agitan las mezclas a TA durante 90 min. Se vierten las mezclas dentro embudos de separación separados junto con agua (300 ml) y EtOAc (400 ml), agitación y partición. Se extraen las capas acuosas con EtOAc (3 x 300 ml), se lavan las respectivas capas orgánicas con agua (4 x 250 ml), NaCl acuoso saturado (200 ml) y se secan sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra a presión reducida. Se purifican los materiales combinados a través de cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 70 % a 100 % de EtOAc en hexanos. Se combinan y concentran las fracciones purificadas a presión reducida. Se



diluye el residuo con EtOAc (500 ml) y se lava con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado (100 ml), NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (100 ml), agua (100 ml) y NaCl acuoso saturado (100 ml). Se secan los orgánicos sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran a presión reducida para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (28,00 g, 76 %). LC-ES/MS *m/z* (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 426,2/428,2 (M+1).

## 5 Preparación 12

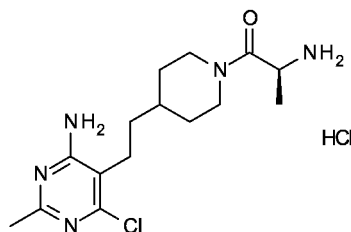
(2S)-2-Amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona



Se disuelve *tert*-butil N-[(1S)-2-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato (15,78 g, 37,05 mmol) en DCM (185 ml), se añade TFA (185 ml) de un modo gota a gota durante 3 min, y se agita durante la noche. Se analiza la reacción mediante LCMS (pH bajo) para mostrar la conversión completa. Se añade lentamente MeOH (400 ml) debido a la mezcla exotérmica. Se levantan previamente tres columnas SCX (50 g) con agua (20 ml) y a continuación MeOH (20 ml). Se divide la mezcla de reacción en tres porciones iguales y se carga por igual sobre las columnas SCX. Se lava cada columna con agua (40 ml) y MeOH (40 ml) recogiendo los lavados en un matraz al vacío. Se eluye el material deseado de las columnas SCX con 2 N amonio en MeOH (60 ml) dentro de un recipiente limpio. Se combinan las soluciones que contienen el producto, se concentran a presión reducida, se mezcla azeotrópicamente con DCM-hexanos (1:1), tres veces y se coloca al vacío para obtener el título del compuesto como una espuma de color blanco (10,29 g, 84 %). LC-ES/MS *m/z* (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 326,2/328,2 (M+1).

## Preparación 13

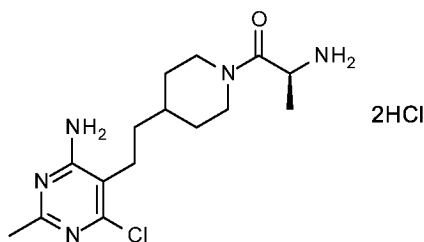
20 (2S)-2-Amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona sal clorhidrato



Se añade *tert*-butil N-[(1S)-2-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato (28,75 g, 67,49 mmol) a 1,4-dioxano (143,7 ml). A continuación se añade 4M de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (168,7 ml, 674,9 mmol) y se agita durante 10 min. Se añade MeOH (20 ml) y se agita la mezcla durante 3 h con agitación vigorosa. Se concentra la mezcla a presión reducida, se diluyen los sólidos con éter de dietilo (200 ml) y se agita durante la noche. Se filtra el material, se aclara con éter de dietilo (2 x 25 ml). Se seca el material a través de succión durante 15 min, a continuación se coloca al vacío durante 1 h a 45 °C para obtener el compuesto del título como un polvo de color blanco crudo (27,7 g). LC-ES/MS *m/z* (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 326,1/328,2 (M+1).

## Preparación 14

30 (2S)-2-Amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona, sal de dihidrocloruro

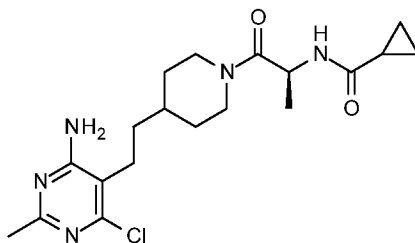


Se calienta IPA (154 ml) a 50 °C y se añade acetil cloruro (19,3 ml, 271 mmol) lentamente debido a una reacción exotérmica. Se agita la reacción a 50 °C durante 10 minutos y a continuación se añade *tert*-butil N-[(1S)-2-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato (21,0 g, 45,3 mmol). Se agita la

reacción durante 2 h controlando a través de LCMS (pH bajo). Se enfría la reacción a TA y se añade éter de dietilo (386 ml). Se agita la suspensión durante 15 min. Se filtran los sólidos, se lava con éter de dietilo (2 x 50 ml) en una manera enérgica ya que el material es hidrocóptico. Se filtra el material y se seca a través de filtración durante 1 min, a continuación en un horno de secado al vacío a 50 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título como un polvo de color blanco (18,4 g). LCES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 326,1/328,2 (M+1). El análisis contra-ión mediante cromatografía por iones es consistente con la sal de dihidrocloruro.

### Ejemplo 1

N-[(1S)-2-[4-[2-(4-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxo-etil]ciclopropanecarboxamida



Se añade 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (281 mg, 2,03 mmol) y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto (430 mg, 2,21 mmol) a una suspensión de ácido ciclopropanocarboxílico (161  $\mu\text{l}$ , 2,03 mmol), (2S)-2-amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona (600 mg, 1,84 mmol) en THF anhidro (12 ml). A continuación se añade TEA (770  $\mu\text{l}$ , 5,52 mmol) y se agita la mezcla resultante a TA durante 12 h. Se diluye la mezcla de reacción con EtOAc (10 ml), se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra el filtrado *in vacuo*. Se purifica el residuo resultante mediante cromatografía de fase reversa HPLC guiada por masa (Agilent® 1200 LCMS y espectrómetro de masa MSD 75 x 30 mm Phenomenex Gemini-NX®, columna de 5  $\mu$  de tamaño de partículas con un protector de 10 x 20 mm, 12-46 % de ACN en 10 mM de solución de bicarbonato de amonio acuoso, pH 10, gradiente sobre 9 min) para obtener el compuesto del título como un vidrio sin color (572 mg, 78 %). LCESMS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 394,2/396,2 (M+H).

### Procedimiento alternativo con anhídrido 1-propanofosfónico

Se trata una mezcla de (2S)-2-amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona, sal de hidrocloreto (107,4 g, 183,15 mmol) en DCM (584 ml) con DIPEA (128 ml, 732,59 mmol). Se enfría la mezcla de reacción a 0 °C en un baño de hielo y se añase ácido ciclopropanocarboxílico (21,8 ml, 274,72 mmol). A continuación se añade una solución de anhídrido 1-propanofosfónico (50 % de solución en EtOAc, 174.8 g, 274.72 mmol) seguido de DIPEA adicional (40 ml) para convertir la mezcla de reacción básica. Agitar a TA durante la noche. Se lava la mezcla de reacción con agua (1 l) y se separan las capas. Se seca la porción orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$  se concentra *in vacuo* para obtener el producto en crudo en forma de una espuma blanquecina. Se purifica el material mediante cromatografía sobre gel de sílice (800 g, 0-10 % MeOH en EtOAc). Las fracciones apropiadas se combinaron con otro producto en lote (51 g) obtenido mediante el seguimiento esencialmente del mismo procedimiento usando (2S)-2-amino-1-[4-[2-(4-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-5-il)etil]-1-piperidil]propan-1-ona, sal de diclorhidrocloreto (77,9 g, 150,42 mmol). Los lotes combinados se concentraron *in vacuo* para obtener un sólido de color blanco (114 g). El producto empezó a cristalizar duante la concentración. Se tritura el material con EtOAc caliente (200 ml) y se filtra para obtener el compuesto del título (111 g, 84 %). LC-ES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 394,0/396,0 (M+1). Análisis quiral (columna OD-H, 25 % de MeOH/ $i\text{PrNH}_2$ , 5,0 ml/min, 100 bar, 35 °C, 220 nm) >99,9% ee;  $T_R$  = 1,15 min.

La GOAT es la principal enzima que convierte UAG en AG. Para revisiones sobre el papel de la GOAT y la ghrelina véase: Kristy M. Heppner y col., The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system: a novel regulator of glucose metabolism, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2011, 18:50-55; Phillip A. Cole y col., Glucose and Weight Control in Mice with a Designed Ghrelin OAcyltransferase Inhibitor, *Science*. 17 de diciembre de 2010; 330(6011): 1689-1692. doi:10.1126/science.1196154, Matthias H. Tschöp y col., Gastric O-acyl transferase activates hunger signal to the brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de abril de 2008; 105(17): 6213-6214, and Jesus Gutierrez, y col., Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 29 abril de 2008, 105 (17): 6320-6325.

El papel de la GOAT se soporta por los fenotipos observados en ratones desprovistos del gen GOAT. Por lo tanto, la inhibición de GOAT se espera que disminuya la circulación de AG y aumente la circulación de UAG. Por consiguiente, la relación de AG respecto a la ghrelina total (UAG + AG) se ve reducida después del tratamiento inhibido de la GOAT.

### Ensayo enzimático de GOAT humano libre de células *in vitro*

El gen GOAT humano (número de referencia: NM\_001100916) está subclonado al vector de expresión baculoviral pAN51. La materia prima de baculovirus se prepara siguiente el protocolo Bac-a-Bac proporcionado por el

proveedor, Invitrogen, California, EE.UU. Se añaden cinco milímetros de materia prima baculoviral de GOAT humano a 500 ml de células Sf9 en un medio HyQ SFX-Insect™ (número de catálogo de HyClone SH30278.02) a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por milímetro en un matraz Erlenmeyer de 2 l. El matraz con células Sf9 infectadas con el gen de la GOAT humano se coloca sobre un agitador de placa a 120 rpm a 28 °C durante 48 h. Después de 48 h de incubación, las células se centrifugan a 1,000xg durante 10 min a 4 °C. Los sedimentos celulares se recogen y almacenan a -80 °C en un congelador hasta que están listos para un procedimiento adicional.

#### Preparación de membrana microsómica de la enzima de GOAT para el ensayo enzimático:

Se suspende un gramo de suspensiones celulares en un tampón de homogenización refrigerado de 9 ml (50 mM de Tris-HCl, 250 mM de sucrosa, se ajusta a pH 7,5 y se filtra de forma estéril a través de un filtro Milipore de 0,2 µm). La suspensión celular se transfiere a un homogeneizador de vidrio Dounce. Las suspensiones celulares se homogenizan con 40 impulsos sobre hielo. El homogeneizado se centrifuga a 3.000 rpm en un rotor de cesto giratorio Beckman a 4 °C durante 10 min para retirar las células no rotas. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 40.000 xg durante 1 h a 4 °C. La suspensión de membrana resultante se suspende en el tampón de homogenización usando un homogeneizador de vidrio Dounce y se almacena a -20 °C en el congelador para el ensayo. Para un almacenamiento de largo tiempo de la preparación de membrana de la enzima de la GOAT humana, la membrana suspendida se almacena en un congelador a -80 °C.

#### Protocolo de ensayo enzimático de la GOAT humana:

Se preparan los compuestos de la prueba en DMSO para conseguir una solución de materia prima de 0,2 mM. Se diluye en serie la solución de materia prima en DMS para obtener una curva de diez puntos con concentraciones de compuesto finales que van desde 10 µM a 0,5 nM en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepara la enzima y las soluciones de sustrato en un tampón de ensayo (0.02 % Tween™-20 en 50 mM Tris, pH 7,5/250 mM de sucrosa/1 mg/ml BSA/10 mM EDTA). Se añade el compuesto diluido (1 µl) a cada pocillo de la fila A a N de una unión de proteína baja correspondiente a una placa de 384 pocillos. Se añade una mezcla de sustrato de GOAT humana (10 µl), que consiste en desacilghrelina-biotina humana (CPC Scientific Inc., 6,0 µM final), octanoil-CoA (Sigma, 60 µM final) y un anticuerpo específico de AG (documento WO 2006/091381)(1.0 µg/ml final), a los compuestos. Se añade la preparación de la enzima GOAT-His/sf9, que se ha preparado en un tampón de ensayo (9 µl), a cada pocillo de la placa que contiene el sustrato y los compuestos de prueba resultando en una concentración final de 0,01 µg/ml para iniciar la reacción. Se incuba la mezcla durante una 1 h a TA sobre un oscilador suavemente rotatorio. Se añade 4 M de hidrocloreuro de guanidina (20 µl) a los pocillos, se mezcla y se incuba durante 3 h para detener la reacción.

Se preparan las placas ELISA (STREPTAVIDIN SPECTRAPLATE™ 384, Perkin Elmer) bloqueando con un 2 % de FBS desactivado de calor en PBS (40 µl) (Invitrogen) tampón de bloqueo durante 3 h. Se aspira el tampón de bloqueo de la placa ELISA y se añade tampón de bloqueo (23 µl) a las columnas 1-24, filas A-N. Se reservan las filas O y P para la curva estándar de acilghrelina. Se añade a la mezcla de reacción (2 µl) a las placas ELISA. Se prepara una curva estándar de 10 puntos (ocatanoil-ghrelina marcada con biotina mediante dilución en serie 2X en el tampón de bloqueo que contiene 0,2M de hidrocloreuro de guanidina de partida a 2,5 pM. Se incuba la mezcla de reacción o el estándar AG marcado con biotina en la placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al siguiente día, se lava la placa 3x con tampón de lavado (0,1 % Tween™-20/PBS, 100 µl por pocillo en cada ciclo de lavado). Se añade el anticuerpo específico AG (documento WO 2006/091381) (25 µl de 0,5 µg/ml en tampón de bloqueo) a cada pocillo y se incuba a TA durante 1 h. Se lava la placa 3x con el tampón de lavado, de forma similar a la etapa anterior. Se añade proteína G-HRP (25 µl)(Southern Biotech) diluida 3.000x en tampón de bloqueo y se incuba 1 h a TA. Se lava el último 3x con un tampón de lavado, como en las etapas anteriores. Se añade reactivo TMB (25 µl) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) a cada pocillo y se deja desarrollar durante 20 min y se detiene con 1 M de ácido fosfórico (25 µl por pocillo). Placas relacionadas a 450 nm usando un lector de placa Envision Multilabel. Se calculan los niveles Ag frente a una curva estándar ajustada y se calcula el porcentaje de inhibición. Se representa y ajusta la curva de inhibición de 10 puntos con una ecuación logística de cuatro parámetros para obtener valores IC<sub>50</sub> usando Activity Base (ver. 7.3.2.1).

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el compuesto del Ejemplo 1 muestra un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 192 nM ± 73, (n = 5). Los datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la actividad de la enzima de la GOAT purificada *in vitro*.

Comparando el cambio en la relación de AC respecto a la ghrelina total en el grupo tratado del compuesto y el del grupo tratado de vehículo refleja el grado de inhibición de enzima de la GOAT *in vivo*, debido al procedimiento dinámico de UAG a AG mediante la enzima de la GOAT. Los estudios farmacodinámicos *in vivo* en el presente documento, los niveles de AG y UAG en plasma y estómago en los grupos vehículo y compuesto tratados se miden mediante ELISA específicamente respecto a estos dos analitos. El nivel total de ghrelina de cada muestra se computa como la suma de AG y UAG por estas mediciones ELISA. La relación de AG respecto al total de ghrelina se define mediante el nivel de AG en cada muestra dividido por el nivel total de ghrelina en la misma muestra. Los niveles de AG, UAG y relación de AG respecto a la ghrelina total en los grupos tratados de vehículo se computa y establece como 100 %. El cambio relativo de estos parámetros en el grupo del compuesto tratado se computa a continuación para determinar la eficacia del compuesto de prueba.

**Estudio BID de 3 días dosis dependiente in vivo para el inhibidor de la GOAT:**Animales y tratamiento:

5 Se compraron ratones C57BL/6 macho de Harlan (Indianapolis, IN) con 9 semanas de edad. Se alojaron los ratones individualmente en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de 12 h luz/oscuridad (luces en 2.200 h) y se deja acceso libre a un roedor estándar comida (dieta 2014, Harlan) y agua. Típicamente, se usan ratones cuando tienen 10-13 semanas de edad en el momento del estudio. El día 0 del experimento, se colocan de forma aleatoria ratones en grupos de tratamiento (N=7/grupo) de modo que cada grupo tiene pesos corporales medios similares. El día 1 y 2, se tratan los animales con un vehículo (1 % hidroxietilcelulosa, 0,25 % Tween 80, 0,05 % de antiespumante) o compuesto de prueba preparado en un vehículo como suspensión a varias dosis mediante sonda bucal a las 7 am y 7 pm. El día 3, se dejan en ayunas los animales, se les trasladan a jaulas limpias y se les dosifica con el vehículo o con el compuesto de prueba de nuevo a las 8 am mediante sonda oral. Ese mismo día a las 1 pm, se sacrifican los animales por decapitación para recoger la sangre. Para detalles sobre recogida de sangre y tratamiento de plasma véase Recogida de plasma y extracción de ghrelina a partir de plasma en la sección a continuación.

15 Recogida de sangre:

Se recogen aproximadamente 600 µl de sangre en un tubo EDTA pesado previamente que contiene 600 µl (definido como  $V_{conservante}$ ) de conservante recién preparado (4 mM PEFABLOC® [4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro hidrocloreuro], NaCl 72 mM, 58 mM NaF, 0,032 N ácido clorhídrico, pH 3,0) y se mezcla inmediatamente. Se pesa el tubo de nuevo y se mantiene sobre hielo. Para determinar de forma precisa el volumen de sangre exacto de cada muestra usando este procedimiento de recogida de sangre, el peso de sangre de cada ratón se computa usando la siguiente ecuación:

$$\text{Peso de sangre} = (\text{Peso del tubo que contiene sangre} + \text{conservante}) - (\text{Peso del tubo que contiene conservante})$$

$$\text{Volumen de sangre } (V_{\text{sangre}}) = (\text{Peso de sangre}) / 1,06$$

25 Nota, la densidad de la sangre de roedor se asume como 1,06 g/ml.

15 minutos después de la recogida de sangre, las muestras se centrifugan a 5.000 rpm a 4 °C durante 8 min. Se retira el plasma (650 µl) a un tubo de vidrio de 5 ml que contiene 1 N de ácido clorhídrico (65µl), se mezcla y mantiene en hielo.

Extracción de ghrelina mediante columna SEP-PAK®:

30 Se extraen AG y UAG del plasma usando una columna SEP-PAK®\_C<sub>18</sub> para retirar la interferencia antes de realizar el ELISA. La extracción de fase sólida de péptidos de AG y UAG mediante columnas SEP-PAK®\_C<sub>18</sub> puede realizarse sobre un colector de vacío (Waters Corp) o usando una bomba perisáltica. El procedimiento de extracción de columna SEP-PAK® de la muestra se aplica independientemente a la muestra de plasma obtenida a partir de cada ratón individual. El protocolo de extracción general se describe a continuación.

35 Todas las soluciones usadas para el protocolo completo de la extracción de columna SEP-PAK® debe estar a una condición de hielo frío. Columnas SEP-PAK® húmedas (WAT054960, Waters Corp, Milford MA) con 99,9 % de ACN/0,1 % de TFA (1 ml de solución de 100 ml de ACN/0,1 ml de TFA). Se aplica presión para ajustar el caudal a aproximadamente 1ml/min para retirar el líquido de la cama de la columna pero no permitir que la columna se seque en ningún punto. Una vez se retira el líquido de la columna, se detiene la presión. Se equilibran las columnas con un 3 % de ACN/0,1 % de TFA (1 ml de 97 ml de agua, 3 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Se aplica presión para ajustar el caudal a aproximadamente 1ml/min para retirar el líquido de la cama de la columna, pero no dejar que la columna se seque. Se diluyen aproximadamente 650 µl de plasma acidificado (definido como  $V_{\text{plasma añadido a columna}}$ ) a 1,4 ml de frío con hielo 0,1 % de TFA. Se carga todo el plasma acidificado diluido de la etapa anteriores sobre las columnas. Se aplica presión para ajustar el caudal a aproximadamente 0,5ml/min para permitir que la muestra pase a través de la columna y los péptidos de ghrelina se absorban sobre la resina de la columna. No se deja secar la columna. Se lava con un 3 % de ACN/0,1 % de TFA (0,9 ml de 97 ml de agua, 3 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Se aplica presión para ajustar el caudal a aproximadamente 1ml/min para retirar el líquido de la cama de la columna pero no se deja la columna secar. Se repite el lavado dos o más veces. Se eluye con un 60 % de ACN/0,1 % de TFA (1 ml de 40 ml de agua, 60 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Se coloca un tubo de recogida por debajo de cada columna, se aplica presión para ajustar el caudal a aproximadamente 0,5 ml/min para empujar el líquido a través de la columna y recoger el eluyente dentro del tubo de recogida. Se congelan las muestras sobre hielo seco inmediatamente. Se liofilizan las muestras en un Speed-vac (Modelo# SC110A, Savant) y se almacenan a -20 °C hasta que se realiza el ensayo ELISA.

Ensayo ELISA para ghrelina:

55 Se recubren placas MULTI-ARRAY® MSD® de 96 pocillos (Meso Scale Discovery, Gaithersberg, MD, Catálogo #

5 L15XA-3) con 100 µl de 1 µg/ml de un anticuerpo (documento WO 2005/026211 y documento WO2006/019577) que reconoce el dominio medio de tanto las formas de acilo como desaciladas de la ghrelina en PBS (Invitrogen). Se ahúsan los laterales de las placas para asegurar un recubrimiento de los pocillos, se sella con un sellador de placa adhesivo y se incuban durante la noche a TA. Se descartan los contenidos y se añade Blocker™ Casein en PBS (25 µl) (Thermo Scientific, Rockford, IL, Catálogo #37528) a cada pocillo. Se vuelven a sellar las placas y se colocan sobre un agitador de placa a TA durante 1 h.

10 Se reconstituyen las muestras de plasma preservadas liofilizadas a partir de la extracción de columna SEP-PAK® C<sub>18</sub> en Blocker™ Casein en PBS (400 µl ta cada muestra, este volumen se define como  $V_{reconstitución}$ ), se mezcla bien con un mezclador vórtex y se incuban sobre hielo durante 45-60 min. Se descartan los contenidos de las placas y se añaden muestras de plasma reconstituido a 25 µl a cada pocillo. Se preparan las curvas estándar de acilghrelina y ghrelina desacilada con 8.000 pg/ml y se realizan diluciones en serie 1:4 para 8 concentraciones totales. Se añaden los estándares preparados por duplicado a las placas bloqueadas con 25 µl en cada pocillo. Se sellan las placas y se incuban a TA sobre un agitador de placa durante 2 h.

15 Se descartan los contenidos de placa y se lavan tres veces con PBS incluyendo 0,1 % de Tween™ 20 (150 µl)(PBS-T). El anticuerpo específico de acilghrelina (documento WO 2006/091381) o el anticuerpo específico de ghrelina desacilada (documento WO 2006/055347) marcado con MSD SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery) se diluyen a 0,05 µg/ml en 0,2 x Blocker Casein que contiene 0,05 % de Tween™ 20, nombrada solución de anticuerpo secundaria. Se retira el lavado final y se añade la solución de anticuerpo secundaria (25 µl a cada pocillo) que reconoce específicamente AG o UAG. Las placas se liberan e incuban durante 1 h a TA sobre un agitador de placa antes de lavar finalmente 3 x de nuevo con PBS-T (150 µl/pocillo).

25 Se descarta el lavado final y se reemplaza con 1 x de tampónd e lectura MSD (150 µl/pocillo). Se lee la señal electroquemiluminiscente generada mediante la activación del límite del marcador MSD SULFO-TAG™ la los electrodos sobre las placas usando el analizador MSD® SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Se calculan las concentraciones de acilghrelina o ghrelina desacilada basándose en la respectiva curva estándar generada mediante el software MSD®. Se determina la concentración de plasma real para cada muestra multiplicando el nivel de acilghrelina o ghrelina desacilada medida por un factor de dilución. El factor de dilución para cada muestra de plasta se computa con la siguiente ecuación.

$$\text{Factor de dilución} = \left( \frac{V_{sangre} + V_{conservante}}{V_{sangre}} \right) \times \left( \frac{V_{reconstitución}}{V_{plasma cargado a columna}} \right)$$

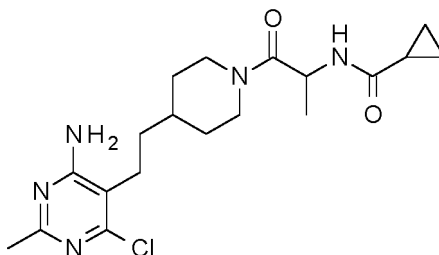
Resultados:

30 Administración del compuesto del Ejemplo 2 durante 3 días aumenta el plasma Ag por un -1 %, 5%, 45 % y 48 %,y el UAG aumenta por 2,24, 2,82, 2,53 y 2,89 veces, respectivamente a 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg (resultados tabulados a continuación). Administración a 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg resulta en 39, 54, 71 y 77 % de reducción respectivamente en AG respecto a la relación de ghrelina total cuando se compara con los animales de control tratados con vehículo. Estos resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 suprime la producción de AG y eleva el UAG en circulación, como se muestra en el ratón eliminado de GOAT, *in vivo*.

Tratamiento	AG (% de control)	UAG (% de control de vehículo)	AG/Ghrelina-total (% de control de vehículo)
Vehículo	100	100	100
0,3 mg/kg	101±25	224±35	61±4
1 mg/kg	95±18	282±45	46±11
3 mg/kg	55±6	253±31	29±4
10 mg/kg	52±10	289±44	23±4

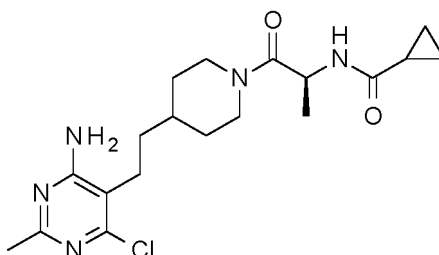
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



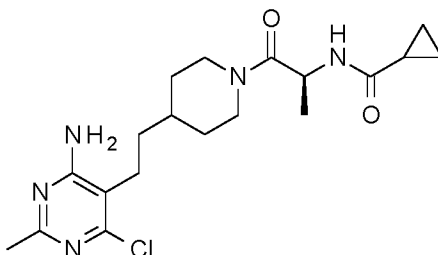
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

5 2. El compuesto de la reivindicación 1 de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 de fórmula



10 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende uno o más de otros agentes terapéuticos.

15 6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de aumento de peso.

20 8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de recuperación de peso.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la obesidad.

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de diabetes del tipo 2.