

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 789**

51 Int. Cl.:

C07D 231/12	(2006.01) A61P 27/02	(2006.01)
A61K 31/415	(2006.01) A61P 27/12	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)	
A61P 3/10	(2006.01)	
A61P 9/04	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 13/12	(2006.01)	
A61P 25/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/JP2014/056825**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142290**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14763385 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2975028**

54 Título: **Compuesto de pirazol-amida y usos medicinales del mismo**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791164 P
15.03.2013 JP 2013053195
18.06.2013 JP 2013127318

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2018

73 Titular/es:

JAPAN TOBACCO, INC. (100.0%)
2-1, Toranomom 2-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8422, JP

72 Inventor/es:

MOTOMURA, TAKAHISA y
SHOMI, GAKUJUN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 663 789 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

Compuesto de pirazol-amida y usos medicinales del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención proporciona un compuesto de pirazol-amida y un uso farmacéutico del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto de pirazol-amida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tiene una actividad inhibitoria de piruvato deshidrogenasa quinasa (en lo sucesivo en el presente documento se va a utilizar la abreviatura PDHK), una composición farmacéutica que contiene al mismo, un agente profiláctico o terapéutico que contiene al mismo para su uso en la profilaxis o tratamiento de diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas, etc.), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar, o enfermedad de Alzheimer,, y similares.

20 **Antecedentes de la técnica**

En tejidos, para reacciones que usan energía tales como biosíntesis, transporte activo, contracción muscular,, y similares, la energía se suministra mediante la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP). El ATP se produce por la oxidación del combustible metabólico que proporciona una gran cantidad de energía, tal como glucosa y ácidos grasos libres. En tejidos oxidativos tales como músculo, el ATP se produce en su mayor medida a partir de acetil-CoA que entra en el ciclo del ácido cítrico. La acetil-CoA se produce por la oxidación de glucosa a través de la ruta glucolítica o β oxidación de ácido graso libre. Una enzima que desempeña un papel fundamental en el control de la producción de acetil-CoA a partir de glucosa es la piruvato deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como PDH). La PDH cataliza la reducción del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) a NADH, de forma simultánea con la oxidación del ácido pirúvico a acetil-CoA y dióxido de carbono (por ejemplo, documentos de no patente 1, 2).

La PDH es un complejo multienzimático que consiste en tres componentes enzimáticos (E1, E2 y E3) y algunas subunidades localizadas en la matriz mitocondrial. E1, E2 y E3 son responsables de la descarboxilación de ácido pirúvico, producción de acetil-CoA y reducción de NAD a NADH, respectivamente.

Dos clases de enzimas que tienen función reguladora se unen a PDH. Una es PDHK, que es una proteína quinasa que tiene especificidad hacia PDH. El papel de la misma es inactivar la subunidad E1 α del complejo mediante fosforilación. La otra es la PDH fosfatasa, que es una proteína fosfatasa específica que activa PDH a través de desfosforilación de la subunidad E1 α . La proporción de PDH en su estado activo (desfosforilado) se determina por el equilibrio de actividad de quinasa y actividad de fosfatasa. La actividad de quinasa está regulada por la concentración relativa de sustratos metabólicos. Por ejemplo, la actividad de quinasa está activada por un aumento en las proporciones de NADH/NAD, acetil-CoA/CoA y ATP/difosfato de adenosina (ADP), y está inhibida por el ácido pirúvico (por ejemplo, documento de no patente 3).

En los tejidos de mamíferos, se identifican 4 tipos de isozimas de PDHK. En particular, PDHK2 se expresa en una amplia gama de tejidos incluyendo el hígado, músculos esqueléticos y tejidos adiposos implicados en el metabolismo de la glucosa. Además, dado que PDHK2 muestra una sensibilidad comparativamente elevada con respecto a la activación por aumento de NADH/NAD o acetil-CoA/CoA e inhibición por ácido pirúvico, se sugiere la implicación en una regulación a corto plazo del metabolismo de la glucosa (por ejemplo, documento de no patente 4).

Además, PDHK1 se expresa en grandes cantidades en músculo cardiaco, músculo esquelético, células β pancreáticas, y similares. Además, dado que la expresión de PDHK1 se induce a través de la activación de factor 1 inducible por hipoxia (HIF) en estado isquémico, se sugiere su implicación en enfermedades isquémicas y enfermedades cancerosas (por ejemplo, documento de no patente 5).

En enfermedades tales como diabetes dependiente de insulina (tipo 1), diabetes no dependiente de insulina (tipo 2), y similares, la oxidación de lípidos se estimula con la reducción simultánea de la utilización de glucosa. Esta reducción de la utilización de glucosa es uno de los factores que causan la hiperglucemia. Cuando el metabolismo oxida tipo de la glucosa disminuye en la diabetes tipo 1 y tipo 2 y en obesidad, la actividad de PDH también disminuye. Sugiere la implicación de la acción de la actividad de PDH en la utilización de glucosa reducida diabetes tipo 1 y tipo 2 (por ejemplo, documentos de no patente 6, 7).

Por el contrario, la gluconeogénesis hepática está aumentada en la diabetes tipo 1 y tipo 2, que también forma un factor que causa hiperglucemia. La reducción de la actividad de PDH aumenta la concentración de ácido pirúvico, que a su vez aumenta la disponibilidad de ácido láctico como un sustrato para la gluconeogénesis hepática. Se

sugiere una posible implicación de la reducción de la actividad de PDH en el aumento de la gluconeogénesis en diabetes tipo 1 y tipo 2 (por ejemplo, documentos de no patente 8, 9). Cuando PDH se activa por inhibición de PDHK, se considera que la tasa de oxidación de glucosa aumenta. Como resultado, la utilización de glucosa en el organismo se estimula y la gluconeogénesis hepática se suprime, de modo que se espera que la hiperglucemia en diabetes tipo 1 y tipo 2 aumente (por ejemplo, documentos de no patente 10, 11, 12). Otro factor que contribuye a la actividad de PDH en células β pancreáticas, e introducción de PDHK1, 2 y 4 (por ejemplo, documentos de no patente 13, 14). Además, se sabe que la hiperglucemia sostenida debida a diabetes produce complicaciones tales como neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, y similares. La tiamina y el ácido α -lipoico contribuyen a la activación de PDH como coenzimas. Se muestra que la tiamina y el ácido α -lipoico, o derivado de tiamina y derivado de ácido α -lipoico tienen un efecto prometedor en el tratamiento de complicaciones diabéticas. Por lo tanto, se espera que la activación de PDH mejore las complicaciones diabéticas (por ejemplo, documentos de no patente 15, 16).

En condiciones isquémicas, el suministro de oxígeno limitado reduce la oxidación tanto de glucosa como de ácido graso y reduce la cantidad de ATP producido por fosforilación oxidativa en los tejidos. En ausencia de oxígeno suficiente, el nivel de ATP se mantiene mediante glucólisis anaeróbica estimulada. Como resultado, el ácido láctico aumenta y el pH intracelular disminuye. Incluso cuando el organismo intenta mantener la homeostasis de iones mediante consumo de energía, un nivel de ATP anómalamente bajo y osmolaridad celular alterada conducen a la muerte celular. Además, la quinasa activante de monofosfato de adenosina, activada durante la isquemia, fosforila y por lo tanto inactiva la acetil-CoA carboxilasa. Los niveles de malonil-CoA total de y en el tejido disminuyen, y por lo tanto la actividad de carnitina palmitoiltransferasa-I aumenta y la oxidación de ácidos grasos se ve favorecida con respecto a la oxidación de glucosa permitiendo el transporte de acil-CoA en las mitocondrias. La oxidación de glucosa es capaz de proporcionar más ATP por molécula de oxígeno que la oxidación de ácidos grasos. En condiciones isquémicas, por lo tanto, cuando el metabolismo de la energía hace que la oxidación de la glucosa sea dominante por activación de PDH, se considera que la capacidad para mantener el nivel de ATP aumenta (por ejemplo, documento de no patente 17).

Además, dado que la activación de PDH produce la oxidación del ácido pirúvico producido por glucólisis, y la reducción de la producción de ácido láctico, se considera que la carga neta de protones se reduce tejidos isquémicos. Por consiguiente, se espera que la activación de PDH por inhibición de PDHK actúe de forma protectora en enfermedades isquémicas tales como isquemia del músculo cardiaco (por ejemplo, documentos de no patente 18, 19).

Se considera que un fármaco que activa PDH por inhibición de PDHK disminuye la producción de lactato ya que estimula el metabolismo del piruvato. Por lo tanto, se espera que un fármaco de este tipo sea útil para el tratamiento de hiperlactacidemia tal como enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial y sepsis (por ejemplo, documento de no patente 20).

En células cancerosas, la expresión de PDHK1 o 2 aumenta. Además, en células cancerosas, la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa en mitocondrias disminuye, y la producción de ATP a través de la glucólisis anaeróbica en el citoplasma aumenta. Se espera que la activación de PDH por inhibición de PDHK estimule la fosforilación oxidativa en mitocondrias, y aumente la producción de oxígeno activo, que inducirá la apoptosis de células cancerosas. Por lo tanto, la activación de PDH por inhibición de PDHK es útil para el tratamiento de enfermedades cancerosas (por ejemplo, documento de no patente 21).

La hipertensión pulmonar se caracteriza por presión sanguínea elevada producida por un estrechamiento parcial de la arteria pulmonar debido a una estimulación celular en la misma. Por lo tanto, en la hipertensión pulmonar, se espera que la activación de PDH en la arteria pulmonar estimule la fosforilación oxidativa en mitocondrias, aumente la producción de oxígeno activo, e induzca la apoptosis de las células de la arteria pulmonar. Por lo tanto, se considera que la activación de PDH por inhibición de PDHK es útil para el tratamiento de hipertensión pulmonar (por ejemplo, documento de no patente 22).

La producción de energía y el metabolismo de glucosa el cerebro disminuyen en la enfermedad de Alzheimer, y además, la actividad de PDH se deteriora. Cuando la actividad de PDH se deteriora, la producción de acetil CoA disminuye. La acetil CoA se utiliza para la producción de ATP en el sistema de transporte de electrones a través del ciclo del ácido cítrico. La acetil CoA también es un material de partida para sintetizar acetilcolina, que es uno de los neurotransmisores. Por lo tanto, se considera que la reducción de la actividad de PDH en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer produce la muerte de las células neuronales debido a la disminución de la producción de ATP. Además, se considera que la síntesis de acetilcolina, que es el transmisor para el nervio colinérgico, se inhibe para inducir el deterioro de la memoria, y similares. Se espera que la activación de PDH en el cerebro aumente la producción de energía y la síntesis de acetilcolina en la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, se considera que la activación de PDH mediante la inhibición de PDHK es útil para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, documentos de no patente 23, 24).

65

Se ha mostrado que el ácido dicloroacético, que es un fármaco que tiene una acción de activación de PDH, proporciona efectos prometedores para el tratamiento de diabetes, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardiaca, hiperlactacidemia, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad arterial periférica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cancerosa, e hipertensión pulmonar (por ejemplo, documentos de no patente 10, 18, 20, 22, 25, 26, 27). Además, el documento WO 2010 041748 A1 desvela compuestos de fluoreno de los que se informa que tienen una actividad inhibitoria de PDHK.

A partir de los hallazgos mencionados anteriormente, útiles para, se considera que un inhibidor de PDHK es útil para la profilaxis o tratamiento de enfermedades que se relacionan con trastornos de utilización de glucosa, por ejemplo, diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas, etc.).

Además, se considera que un inhibidor de PDHK es útil para la profilaxis o tratamiento de enfermedades causadas por suministro limitado de sustrato de energía a los tejidos, por ejemplo, insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral y ictus hemorrágico.

Por lo tanto, se considera que un inhibidor de PDHK es útil para el tratamiento o profilaxis de diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas, etc.), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer.

Listado de Documentos

Documentos de no patente

documento de no patente 1: Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases.

J Biol Chem. 5 de junio de 1990; 265 (16): 8971-4.

documento de no patente 2: Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. FASEB J. Nov de 1990; 4 (14): 3224-33.

documento de no patente 3: Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. Am J Physiol Endocrinol Metab. Mayo de 2003; 284 (5): E855-62.

documento de no patente 4: Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Biochem J. 1 de enero de 1998; 329 (Pt 1): 191-6.

documento de no patente 5: Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. Marzo de 2006; 3 (3): 177-85.

documento de no patente 6: Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, *et al.* Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. J Clin Invest. Diciembre de 2005; 115 (12): 3587-93.

documento de no patente 7: Caterson ID, Fuller SJ, Randle PJ. Effect of the fatty acid oxidation inhibitor 2-tetradecylglycidic acid on pyruvate dehydrogenase complex activity in starved and alloxan-diabetic rats. Biochem J. 15 de octubre de 1982; 208 (1): 53-60.

documento de no patente 8: Boden G, Chen X, Stein TP. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. Am J Physiol Endocrinol Metab. Enero de 2001; 280 (1): E23-30.

documento de no patente 9: Shangraw RE, Fisher DM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dichloroacetate in patients with cirrhosis. Clin Pharmacol Ther. Octubre de 1999; 66 (4): 380-90.

documento de no patente 10: Stacpoole PW, Moore GW, Kornhauser DM. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. N Engl J Med. 9 de marzo de 1978; 298 (10): 526-30.

documento de no patente 11: Mayers RM, Leighton B, Kilgour E. PDH kinase inhibitors: a novel therapy for Type II diabetes? Biochem Soc Trans. Abril de 2005; 33 (Pt 2): 367-70.

documento de no patente 12: Jeoung NH, Rahimi Y, Wu P, Lee WN, Harris RA. Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice. Biochem J. 1 de mayo de 2012; 443 (3): 829-39.

documento de no patente 13: Zhou YP, Berggren PO, Grill V. A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta-cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. Diabetes. Mayo de 1996; 45 (5): 580-6.

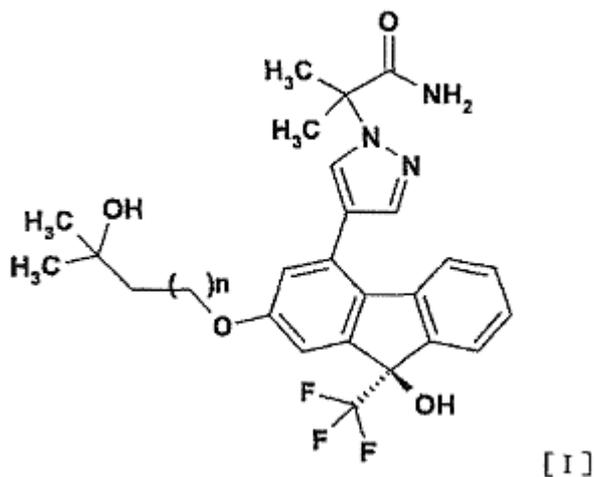
documento de no patente 14: Xu J, Han J, Epstein PN, Liu YQ. Regulation of PDK mRNA by high fatty acid and glucose in pancreatic islets. Biochem Biophys Res Commun. 9 de junio de 2006; 344 (3): 827-33.

documento de no patente 15: Benfotiamine. Monograph. Altern Med Rev. Septiembre de 2006; 11 (3): 238-42.
 documento de no patente 16: Vallianou N, Evangelopoulos A, Koutalas P. Alpha-lipoic Acid and diabetic neuropathy. Rev Diabet Stud. 2009 Winter; 6 (4): 230-6.
 documento de no patente 17: Ussher JR, Lopaschuk GD. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. Cardiovasc Res. 15 de julio de 2008; 79 (2): 259-68.
 documento de no patente 18: Wargovich TJ, MacDonald RG, Hill JA, Feldman RL, Stacpoole PW, Pepine CJ. Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease. Am J Cardiol. 1 de enero de 1988; 61 (1): 65-70.
 documento de no patente 19: Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, Pehowich DJ, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Abril de 2001; 280 (4): H1762-9.
 documento de no patente 20: Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. J Clin Pharmacol. Julio de 2003; 43 (7): 683-91.
 documento de no patente 21: Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, *et al.* A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. Cancer Cell. Enero de 2007; 11 (1): 37-51.
 documento de no patente 22: McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, *et al.* Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. Circ Res. 15 de octubre de 2004; 95 (8): 830-40.
 documento de no patente 23: Saxena U. Bioenergetics breakdown in Alzheimer's disease: targets for new therapies. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011; 3 (2): 133-9.
 documento de no patente 24: Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. Aging Cell. Junio de 2012; 11 (3): 371-7.
 documento de no patente 25: Marangos PJ, Turkel CC, Dziewanowska ZE, Fox AW. Dichloroacetate and cerebral ischaemia therapeutics. Expert Opin Investig Drugs. Abril de 1999; 8 (4): 373-82.
 documento de no patente 26: Calvert LD, Shelley R, Singh SJ, Greenhaff PL, Bankart J, Morgan MD, *et al.* Dichloroacetate enhances performance and reduces blood lactate during maximal cycle exercise in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 15 de mayo de 2008; 177 (10): 1090-4.
 documento de no patente 27: Flavin DF. Non-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dichloroacetate. J Oncol. Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology, Volumen 2010, ID del Artículo 414726, 4 páginas doi:10.1155/2010/414726.

Sumario de la Invención

La presente invención es como sigue a continuación.

[1] Un compuesto representado por la fórmula [I]:

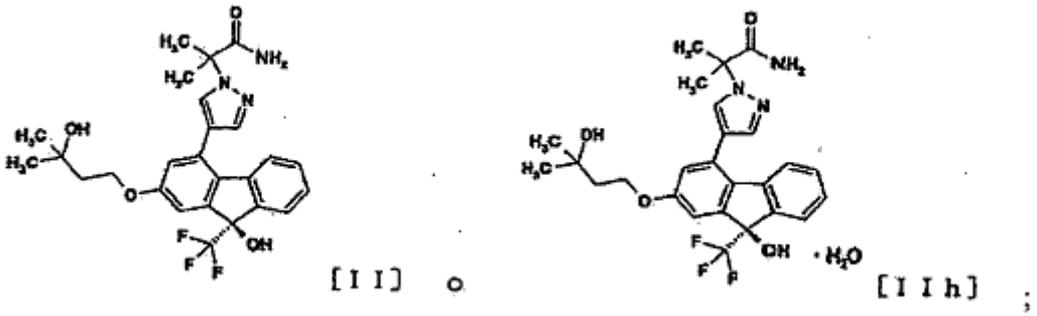


40

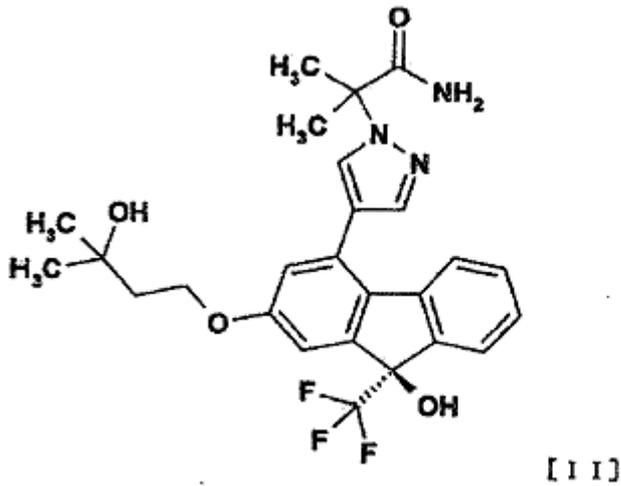
en la que n es 1 o 2,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[2] el compuesto de [1] mencionado anteriormente, que se representa con las fórmulas:

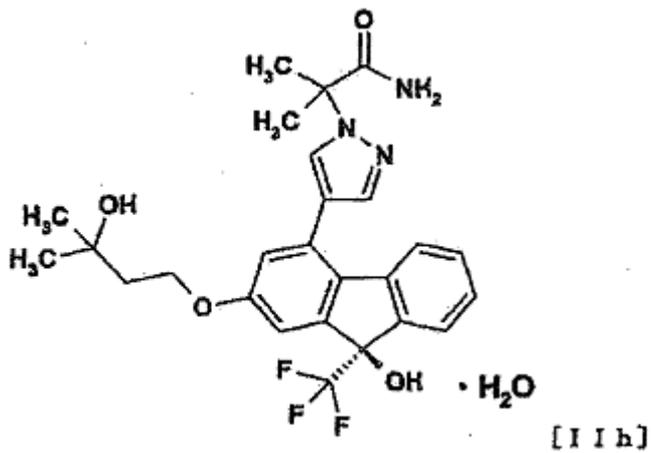


[3] el compuesto de [2] mencionado anteriormente, que se representa con la fórmula [III]:



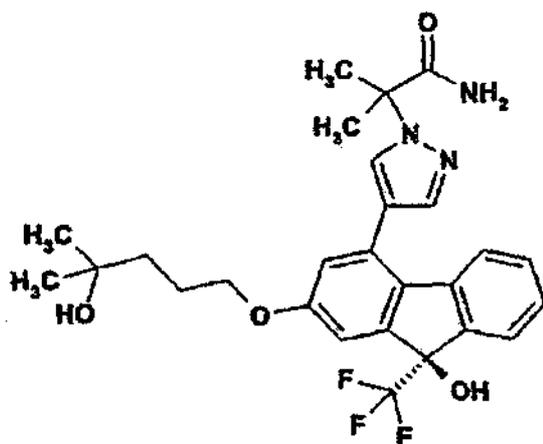
5

[4] el compuesto de [2] mencionado anteriormente, que se representa con la fórmula [IIIh]:



10

[5] el compuesto de [1] mencionado anteriormente, que se representa con la fórmula [III]:



[I I I]

;

[6] una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

[7] un inhibidor de PDHK que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[8] un inhibidor de PDHK1 que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[9] un inhibidor de PDHK2 que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[10] un agente hipoglucémico que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[11] un agente para reducir el ácido láctico que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[12] un agente para su uso en la profilaxis o tratamiento de diabetes,

síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedades mitocondriales, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer o hipertensión pulmonar, que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo; [12'] un agente para su uso en la profilaxis o tratamiento de diabetes, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía,

isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer, que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo;

[13] el agente para su uso de acuerdo con [12] mencionado anteriormente, en el que la diabetes es diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2;

[14] el agente para su uso de acuerdo con [12] mencionado anteriormente, en el que las complicaciones diabéticas se seleccionan entre el grupo que consiste en neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética y cataratas;

[15] el agente para su uso de acuerdo con [12] mencionado anteriormente, en el que la insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca aguda o insuficiencia cardiaca crónica;

[16] una composición farmacéutica que comprende

(a) el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, y

(b) al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer e hipertensión pulmonar;

[16'] una composición farmacéutica que comprende

(a) el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, y

(b) al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar y enfermedad de Alzheimer;

[17] un fármaco de combinación que comprende

(a) el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, y

(b) al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer e hipertensión pulmonar, que se administran de forma simultánea, por separado o de forma continua;

[17'] un fármaco de combinación que comprende

(a) el compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, y

(b) al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar y enfermedad de Alzheimer, que se administran de forma simultánea, por separado o de forma continua;

[18] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un inhibidor de PDHK;

[19] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un inhibidor de PDHK1;

[20] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un inhibidor de PDHK2;

[21] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un agente para reducir el nivel de glucosa en sangre;

[22] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un agente para reducir el nivel de lactato;

[23] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un agente profiláctico o terapéutico para diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer o hipertensión pulmonar;

[23'] uso del compuesto de cualquiera de [1] a [5] mencionados anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para la producción de un agente profiláctico o terapéutico para diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca

crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer;

[24] el uso de cualquiera de [18] a [23] mencionados anteriormente, en combinación con al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer e hipertensión pulmonar; y

[24'] el uso de cualquiera de [18] a [23] mencionados anteriormente, en combinación con al menos otro medicamento eficaz para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar y enfermedad de Alzheimer,, y similares.

Efecto de la invención

El compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo inhibe una actividad de PDHK, y es útil como un agente terapéutico o profiláctico para diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer,, y similares.

Breve descripción de las figuras

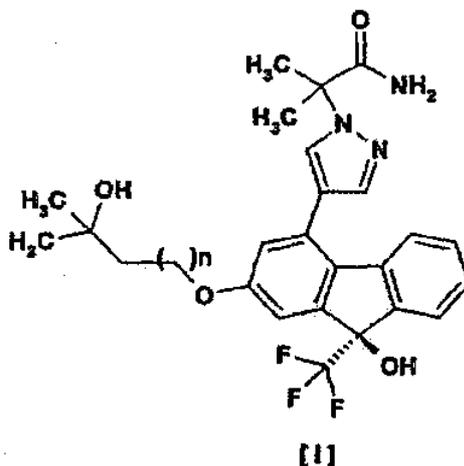
La Fig. 1 muestra un efecto de compuestos de ensayo en la actividad de PDH hepática (porcentaje de actividad de PDH hepática activa con respecto a la actividad total de PDH hepática) en ratas SD(IGS) que no están en ayunas (media \pm desviación estándar (n = 3)).

La Fig. 2 muestra un efecto de compuestos de ensayo en la actividad de PDH de tejido adiposo (porcentaje de actividad de PDH de tejido adiposo con respecto a la actividad total de PDH de tejido adiposo) en ratas SD(IGS) que no están en ayunas (media \pm desviación estándar (n = 3)).

Descripción de realizaciones

En lo sucesivo se explica con detalle la presente invención.

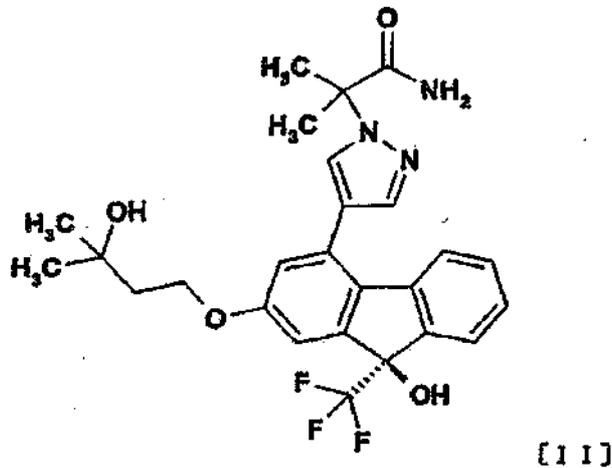
El compuesto de la presente invención es un compuesto representado por la fórmula [I]:



en la que n es 1 o 2,

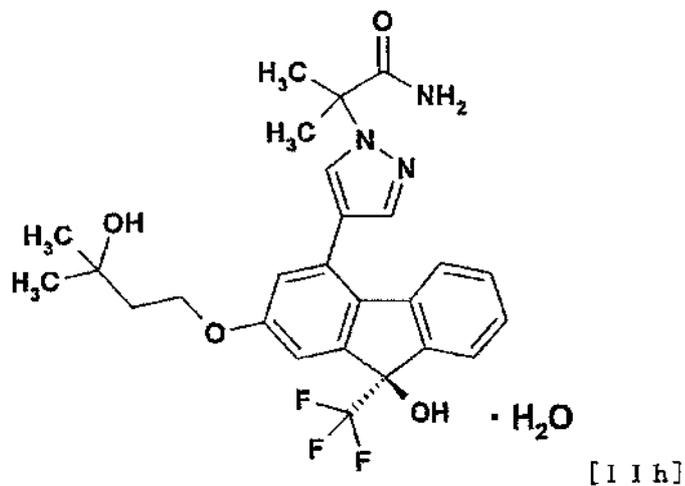
(en lo sucesivo en el presente documento también denominado compuesto (1)), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo.

5 El compuesto de la presente invención es un compuesto representado por la fórmula [II]:



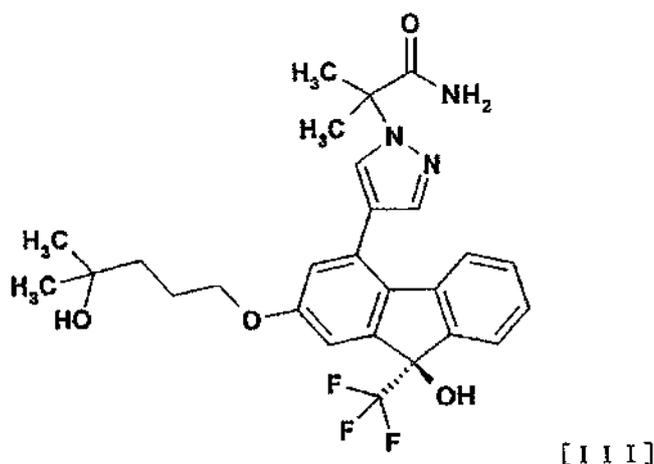
10 (2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida) (en lo sucesivo en el presente documento también denominado compuesto (2)).

El compuesto de la presente invención es un compuesto representado por la fórmula [IIh]:



15 (Monohidrato de 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida) (en lo sucesivo en el presente documento también denominado compuesto (2h)).

20 El compuesto de la presente invención es un compuesto representado por la fórmula [III]:



(2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida) (en lo sucesivo en el presente documento también denominado compuesto (3)).

5 Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la presente invención puede ser cualquier sal siempre y cuando forme una sal no tóxica con el compuesto de la presente invención. Los ejemplos de las mismas incluyen sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, sales con aminoácidos, y similares.

10 Los ejemplos de la sal con ácido inorgánico incluyen una sal con ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, y similares.

15 Los ejemplos de la sal con ácido orgánico incluyen sales con ácido oxálico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido metanosulfónico, ácido benenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, y similares.

Los ejemplos de la sal con aminoácido incluyen sales con lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, y similares.

20 Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la presente invención es preferentemente una sal con un ácido inorgánico.

Además, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede marcar con un isótopo (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, etc.).

25 Como el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es preferente el compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cada uno de los cuales está sustancialmente purificado. Es más preferente el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cada uno de los cuales se purifica hasta una pureza que no es inferior a un 80 %.

30 El compuesto de fórmula [I] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede existir como un solvato. El término "solvato" se refiere al compuesto de fórmula [I] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con el que se asocia a una molécula de disolvente, y también incluye hidratos. Los solvatos de este tipo son preferentemente solvatos farmacéuticamente aceptables. Los solvatos de este tipo incluyen, por ejemplo, hidrato, solvato de etanol, solvato de dimetilsulfóxido, y similares del compuesto de fórmula [I] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos específicos incluyen hemihidrato, monohidrato, dihidrato o mono (etanol) solvato del compuesto de fórmula [I] o un monohidrato del compuesto de fórmula [I], 2/3(etanol)solvato de clorhidrato del mismo, y similares. Los solvatos de este tipo se pueden producir de acuerdo con métodos convencionales.

40 Los ejemplos de la "composición farmacéutica" incluyen preparaciones orales tales como comprimido, capsular, gránulo, polvo, trocisco, jarabe, emulsión, suspensión, y similares, y agentes parenterales tales como preparación externa, supositorio, inyección, gota ocular, preparación nasal, preparación pulmonar, y similares.

45 La composición farmacéutica de la presente invención se produce de acuerdo con un método conocido *per se* en la técnica de preparaciones farmacéuticas, mezclando el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con una cantidad adecuada de al menos un tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable, y similares si fuera apropiado. Aunque el contenido del compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la composición farmacéutica varía dependiendo de la forma de dosificación, dosis, y similares, es, por ejemplo, de un 0,1 a un 100 % en peso de toda la composición.

5 Los ejemplos del "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluyen diversas sustancias vehículo orgánico o inorgánico usadas convencionalmente como materiales de preparación, por ejemplo, excipiente, agente disgregante, aglutinante, fluidizante, lubricante, y similares para preparaciones sólidas, y disolvente, agentes solubilizante, agente de suspensión, agente de isotonicidad, agente de tamponamiento, agente calmante, y similares para preparaciones líquidas. Cuando sea necesario, además, se usan aditivos tales como conservante, antioxidante, colorante, agente edulcorante, y similares.

10 Los ejemplos del "excipiente" incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, D-sorbitol, almidón de maíz, dextrina, celulosa microcristalina, celulosa cristalina, carmelosa, carmelosa cálcica, almidón de carboximetil sodio, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, goma arábica, y similares.

15 Los ejemplos del agente "disgregante" incluyen carmelosa, carmelosa cálcica, carmelosa sódica, almidón de carboximetil sodio, croscarmelosa sódica, crospovidona, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa cristalina, y similares.

Los ejemplos del agente "aglutinante" incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona, celulosa cristalina, sacarosa, dextrina, almidón, gelatina, carmelosa sódica, goma arábica, y similares.

20 Los ejemplos del agente "fluidizante" incluyen ácido silícico anhidro ligero, estearato de magnesio, y similares.

Los ejemplos del agente "lubricante" incluyen estearato de magnesio, estearato cálcico, talco, y similares.

25 Los ejemplos del "disolvente" incluyen agua purificada, etanol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva, y similares.

Los ejemplos de los "agentes solubilizantes" incluyen propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trietanolamina, carbonato sódico, citrato sódico, y similares.

30 Los ejemplos del "agente de suspensión" incluyen cloruro de benzalconio, carmelosa, hidroxipropilcelulosa, propilenglicol, povidona, metilcelulosa, monoestearato de glicerol, y similares.

Los ejemplos del "agente isotónico" incluyen glucosa, D-sorbitol, cloruro sódico, D-manitol, y similares.

35 Los ejemplos del "agente de tamponamiento" incluyen hidrogenofosfato sódico, acetato sódico, carbonato sódico, citrato sódico, y similares.

Los ejemplos del "agente calmante" incluyen alcohol bencílico, y similares.

40 Los ejemplos del "conservantes" incluyen parahidroxibenzoato de etilo, clorobutanol, alcohol bencílico, deshidroacetato sódico, ácido sórbico, y similares.

Los ejemplos del "antioxidante" incluyen sulfito sódico, ácido ascórbico, y similares.

45 Los ejemplos del "colorante" incluyen colorantes alimentarios (por ejemplo, Color Rojo Alimentario N.º 2 o 3, Color Amarillo Alimentario N.º 4 o 5 etc.), β -caroteno, y similares.

Los ejemplos del "agente edulcorante" incluyen sacarina sódica, glicirricinato dipotásico, aspartamo, y similares.

50 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o por vía parenteral (por ejemplo, administración tópica, intramuscular, subcutánea, rectal, intravenosa, etc.) al ser humano así como mamíferos distintos del ser humano (por ejemplo, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, gato, perro, cerdo, bovino, caballo, oveja, mono, etc.). La dosis varía dependiendo del sujeto de administración, enfermedad, síntoma, forma de dosificación, vía de administración, y similares. Por ejemplo, la dosis diaria para administración oral en un paciente adulto (peso corporal: aproximadamente 60 kg) está generalmente dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg a 55 1 g, basándose en el compuesto (1) como el principio activo. Esta cantidad se puede administrar en una o varias porciones.

60 Dado que el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene una actividad inhibitoria de PDHK (PDHK1 y/o PDHK2), se considera que es ventajoso para el tratamiento o profilaxis de las enfermedades que se relacionan con una alteración de la utilización de glucosa, por ejemplo, diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas, etc.). Además, se considera que el inhibidor de PDHK es ventajoso para el tratamiento o profilaxis de enfermedades en las que el suministro de un sustrato de energía a un tejido está limitado, por ejemplo, insuficiencia 65 cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente,

enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral y ictus hemorrágico. Además, se considera que el inhibidor de PDHK es ventajoso para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer,, y similares.

5 La diabetes es, por ejemplo, diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.

Los ejemplos de las complicaciones diabéticas incluyen neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética y cataratas.

10 La insuficiencia cardiaca es, por ejemplo, insuficiencia cardiaca aguda o insuficiencia cardiaca crónica.

"Inhibir PDHK" se refiere a inhibir la función de PDHK y eliminar o atenuar la actividad. Para "inhibir PDHK", se inhibe preferentemente la PDHK humana. Como un "inhibidor de PDHK", es preferente de un "inhibidor PDHK de humana".

15 "Inhibir PDHK1" se refiere a inhibir la función de PDHK1 y eliminar o atenuar la actividad. Por ejemplo, se refiere a inhibir la función como PDHK1 basándose en las condiciones en el Ejemplo Experimental 1 que se menciona a continuación. Para "inhibir PDHK1", se inhibe preferentemente la PDHK1 humana. Como un "inhibidor de PDHK1", es preferente un "inhibidor de PDHK1 humana". Es más preferente un "inhibidor de PDHK1 para un órgano diana humano".

20 "Inhibir PDHK2" se refiere a inhibir la función de PDHK2 y eliminar o atenuar la actividad. Por ejemplo, se refiere a inhibir la función como PDHK2 basándose en las condiciones en el Ejemplo Experimental 1 que se menciona a continuación. Para "inhibir PDHK2", se inhibe preferentemente la PDHK2 humana. Como un "inhibidor de PDHK2", es preferente un "inhibidor de PDHK2 humana". Es más preferente un "inhibidor de PDHK2 para un órgano diana humano".

25 "Activar PDH" se refiere a activar PDH en un órgano diana (por ejemplo, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo, corazón, cerebro), y similares, cáncer o similares.

30 "Disminuir el nivel de glucosa en sangre" se refiere a disminuir la concentración de glucosa en sangre (incluyendo en suero y plasma), preferentemente disminuir el nivel de glucosa en sangre elevado, más preferentemente, disminuir el nivel de glucosa en sangre hasta un nivel normal terapéuticamente eficaz para el ser humano.

35 "Disminuir el nivel de ácido láctico" se refiere a disminuir la concentración de ácido láctico en sangre (incluyendo en suero y plasma), preferentemente disminuir el nivel de ácido láctico elevado, más preferentemente, disminuir el nivel de ácido láctico hasta un nivel normal terapéuticamente eficaz para el ser humano.

40 El compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar en combinación con uno o una pluralidad de otros medicamentos (en lo sucesivo en el presente documento también Fármaco simultáneo) de acuerdo con un método usado generalmente en el campo médico (en lo sucesivo en el presente documento se va a denominar uso combinado).

45 El periodo de administración del compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un fármaco simultáneo no está limitado, y se pueden administrar a un sujeto de administración como preparación en combinación, o ambas preparaciones se pueden administrar de forma simultánea o a intervalos dados. Además, la composición farmacéutica de la presente invención y un fármaco simultáneo se pueden usar como un medicamento en forma de un kit. La dosis del fármaco simultáneo es similar a la dosis clínicamente usada y se puede seleccionar de forma apropiada de acuerdo con el sujeto de administración, enfermedad, síntoma, forma de dosificación, vía de administración, tiempo de administración, combinación, y similares. La forma de administración del fármaco simultáneo no está limitada en particular, y solamente necesita ser combinado con el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 Los ejemplos del fármaco de combinación incluyen agentes terapéuticos y/o agentes profilácticos para diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar o enfermedad de Alzheimer,, y similares, y se pueden usar uno o más agentes a partir de los mismos y el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación.

60 Los ejemplos del "agente para el tratamiento y/o profilaxis de diabetes" incluyen preparación de insulina, agente hipoglucémico sulfonilurea, metformina, inhibidor de DPP-4, agente para mejorar la resistencia a la insulina (por ejemplo, derivado de tiazolidina), agonista del receptor GLP-1, y similares.

Ejemplos

El método de producción del compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se explica de forma específica con los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos Ejemplos.

5 Incluso si no se encuentra descripción en el presente método de producción, las etapas se pueden modificar para una producción eficaz, tal como introducción de un grupo protector en un grupo funcional cuando sea necesario con desprotección en una etapa posterior, usando un grupo funcional como un precursor en a la etapa, seguido de conversión a un grupo funcional deseado en un estadio adecuado, cambiando el orden de los métodos y etapas de producción, y similares.

15 El tratamiento después de reacción en cada etapa se puede realizar con un método convencional, en el que el aislamiento y la purificación se pueden realizar si fuera necesario de acuerdo con un método seleccionado apropiadamente a partir de métodos convencionales tales como cristalización, recristalización, destilación, reparto, cromatografía sobre gel de sílice, HPLC preparativa, y similares, o una combinación de los mismos. Todos los reactivos y disolventes tienen calidad de productos disponibles en el mercado, y se usaron sin purificación.

20 El porcentaje, %, muestra % en peso. Otras abreviaturas usadas en la sección de ejemplos se refieren a lo que sigue a continuación.

25 s: singlete
d: duplete
t: triplete
c: cuadruplete
m: multiplete
a: ancho
dd: duplete de duplete
td: triplete de duplete
ddd: duplete de duplete de duplete
30 J: constante de acoplamiento
CDCl₃: cloroformo deuterado
DMSO-D₆: dimetilsulfóxido deuterado
RMN ¹H: resonancia magnética nuclear de protón
HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
35 DPPA: azida de difenilfosforilo

El espectro de RMN ¹H se midió en CDCl₃ o DMSO-D₆ usando tetrametilsilano como un patrón interno, y los 5 valores se muestran en ppm.

40 (Tampón fosfato 10 mM (pH 2,0))

El dihidrogenofosfato sódico (3,60 g) se disolvió en agua (3000 ml), y se ajustó a pH 2,0 con ácido fosfórico para dar el tampón del título.

45 Condiciones del análisis de HPLC

Condición 1 del análisis

50 Dispositivo de medición: sistema HPLC de Prominence de cromatografía líquida de alto rendimiento de SHIMADZU CORPORATION

Columna: DAICEL CHIRALCEL DO-3R 4,6 mmΦ x 150 mm
Temperatura de la columna: 40 °C
Fase móvil: (SOLUCIÓN A) tampón fosfato 10 mM (pH 2,0), (SOLUCIÓN B) acetonitrilo

55 La composición de la fase móvil (SOLUCIÓN A:SOLUCIÓN B) se cambió linealmente de 50:50 a 20:80 durante 20 min y a continuación se mantuvo a 20:80 durante 5 min.

60 Caudal: 0,5 ml/min
Detección: UV (220 nm)

Condición 2 del análisis

65 Dispositivo de medición: sistema HPLC de Prominence de cromatografía líquida de alto rendimiento de SHIMADZU CORPORATION Columna: DAICEL CHIRALCEL OJ-RH 4,6 mmΦ x 150 mm

Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil: (SOLUCIÓN A) tampón fosfato 10 mM (pH 2,0), (SOLUCIÓN B) acetonitrilo

5 La composición de la fase móvil (SOLUCIÓN A:SOLUCIÓN B) se cambió linealmente de 70:30 a 40:60 durante 20 min y a continuación se mantuvo a 40:60 durante 10 min.

Caudal: 0,5 ml/min

Detección: UV (220 nm)

10 Condición 3 del análisis

Dispositivo de medición: sistema HPLC de Prominence de cromatografía líquida de alto rendimiento de SHIMADZU CORPORATION Columna: DAICEL CHIRALPAK AD-3R 4,6 mmΦ x 150 mm

15 Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil: (SOLUCIÓN A) tampón fosfato 10 mM (pH 2,0), (SOLUCIÓN B) acetonitrilo

20 La composición de la fase móvil (SOLUCIÓN A:SOLUCIÓN B) se cambió linealmente de 50:50 a 20:80 durante 20 min y a continuación se mantuvo a 20:80 durante 5 min.

Caudal: 0,5 ml/min

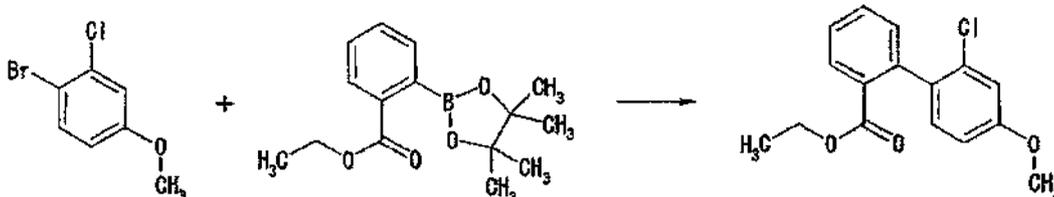
Detección: UV (220 nm)

25 Ejemplo 1

Síntesis de 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2))

Etapa 1

30 2'-Cloro-4'-metoxibifenil-2-carboxilato de etilo

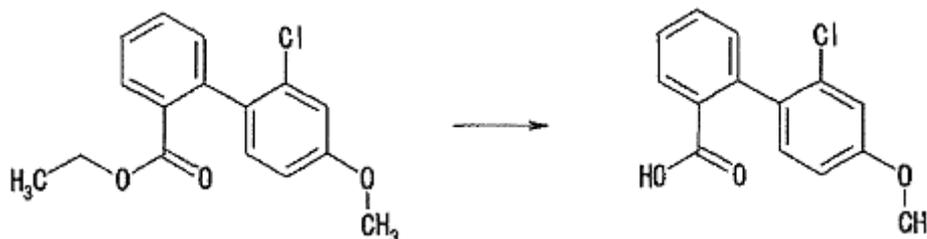


35 En una atmósfera de argón, 1-bromo-2-cloro-4-metoxibenceno (44,3 g) se disolvió en tolueno (220 ml), se añadieron 2-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)benzoato de etilo (60,8 g), agua (132 ml), hidrogenocarbonato sódico (33,6 g) y diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (2,8 g), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 120 °C durante 7 h. A la mezcla de reacción se añadió 2-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)benzoato de etilo (5,2 g), y la mezcla se agitó adicionalmente durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron tolueno (100 ml) y agua (200 ml), y la mezcla se agitó durante una noche. A la mezcla de reacción se añadió carbón activado (3 g), y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 h. El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite, y el material insoluble se lavó con tolueno (100 ml) y agua (200 ml). Los filtrados obtenidos se combinaron para permitir la separación de las fases. La fase orgánica obtenida se lavó con agua (100 ml), y el disolvente se evaporó para dar el compuesto del título (67,7 g).

45 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 7,88-7,86 (1H, m), 7,63 (1H, td, J = 7,6, 1,4 Hz), 7,51 (1H, td, J = 7,6, 1,4 Hz), 7,27 (1H, dd, J = 7,6, 0,9 Hz), 7,18 (1H, d, J = 8,6 Hz), 7,06 (1H, d, J = 2,6 Hz), 6,95 (1H, dd, J = 8,6, 2,6 Hz), 4,01 (2H, m), 3,80 (3H, s), 0,96 (3H, t, J = 7,1 Hz).

Etapa 2

Ácido 2'-cloro-4'-metoxibifenil-2-carboxílico



5

El 2'-cloro-4'-metoxibifenil-2-carboxilato de etilo (67,7 g) se disolvió en etanol (100 ml), se añadió hidróxido sódico acuoso 4 N (100 ml), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 110 °C durante 4,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron agua (200 ml) y tolueno (100 ml), y la mezcla se agitó durante una noche. A la mezcla de reacción se añadió carbón activado (3,6 g), y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 h. El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite, y el material insoluble se lavó con tolueno (30 ml) y agua (300 ml). Los filtrados obtenidos se combinaron para permitir la separación de las fases. La fase acuosa obtenida se lavó con tolueno (100 ml), la fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (40 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se secó al aire durante 3 h, y se secó a presión reducida a 60 °C durante una noche para dar el compuesto del título (50,2 g).

10

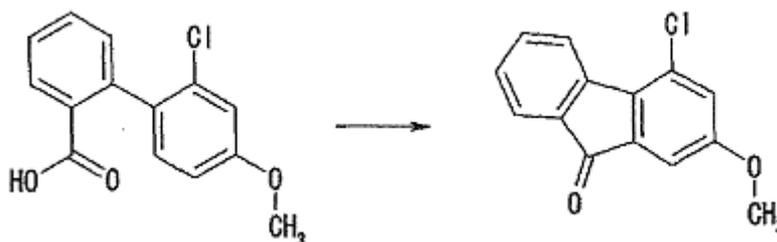
15

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 12,57 (1H, s), 7,90-7,88 (1H, m), 7,60 (1H, td, J = 7,6, 1,3 Hz), 7,49 (1H, td, J = 7,6, 1,3 Hz), 7,24 (1H, dd, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,19 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,06 (1H, d, J = 2,4 Hz), 6,95 (1H, dd, J = 8,5, 2,4 Hz), 3,81 (3H, s).

20

Etapa 3

4-Cloro-2-metoxi-9H-fluoren-9-ona



25

En una atmósfera de argón, al ácido 2'-cloro-4'-metoxibifenil-2-carboxílico (65,4 g) se añadió un reactivo de Eaton (solución de pentóxido de fósforo - ácido metanosulfónico (proporción de peso de 1:10), 330 ml), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 100 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió en hielo, se añadió agua (650 ml) lentamente gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con agua (500 ml). El sólido obtenido se sacó al aire durante una noche para dar el compuesto del título (92,0 g).

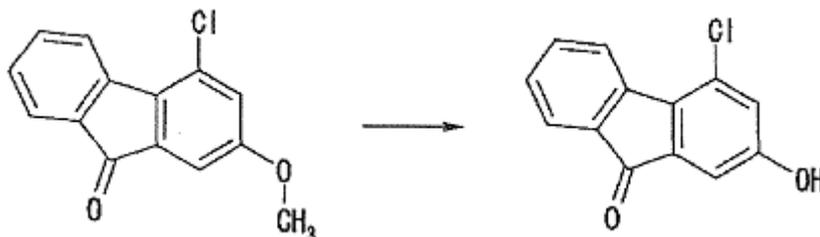
30

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,01 (1H, d, J = 7,4 Hz), 7,64-7,60 (2H, m), 7,36 (1H, td, J = 7,4, 0,9 Hz), 7,17 (2H, dd, J = 8,4, 2,3 Hz), 3,85 (3H, s).

35

Etapa 4

4-Cloro-2-hidroxi-9H-fluoren-9-ona



5

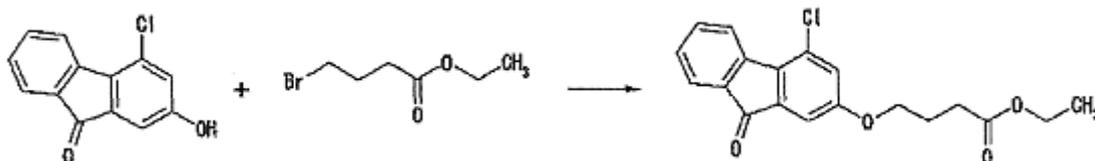
En una atmósfera de argón, a la 4-cloro-2-metoxi-9H-fluoren-9-ona (92,0 g) se añadieron N-metilpirrolidona (120 ml) y clorhidrato de piridina (144 g). La mezcla de reacción se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 200 °C durante 3 h con retirada de agua con un aparato de Dean-Stark. La mezcla de reacción se enfrió a 90 °C, se añadió agua (600 ml) gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con agua (400 ml). El sólido obtenido se secó al aire durante 3 días, se añadió un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (hexano: acetato de etilo a 1:1, 300 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido se recogió por filtración, y se lavó con un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (hexano: acetato de etilo = 1:1, 500 ml). El sólido obtenido se secó a presión reducida a 50 °C durante 3 h para dar el compuesto del título (48,6 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 10,56 (1H, s), 7,96 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,61-7,57 (2H, m), 7,32 (1H, td, J = 7,4, 0,9 Hz), 6,97 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,94 (1H, d, J = 2,2 Hz).

Etapa 5

20

4-(4-Cloro-9-oxo-9H-fluoren-2-iloxi)butirato de etilo



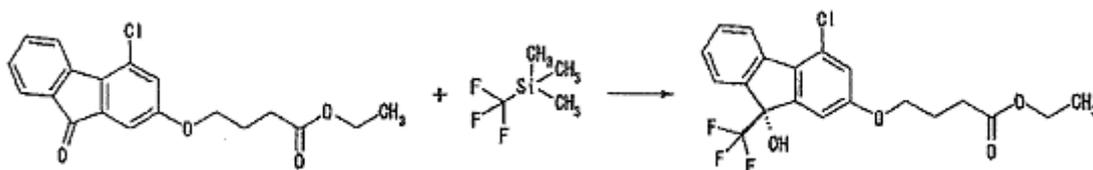
La 4-cloro-2-hidroxi-9H-fluoren-9-ona (48,6 g) se disolvió en N,N-dimetilformamida (150 ml), se añadieron carbonato potásico (58,3 g) y 4-bromobutirato de etilo (33,5 ml), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a 40 °C, y se añadieron tolueno (300 ml) y agua (300 ml) para permitir la separación de las fases. La fase acuosa obtenida se extrajo de nuevo con tolueno (100 ml). Las fases orgánicas obtenidas se combinaron, se lavaron dos veces con agua (100 ml), se añadieron sulfato sódico anhidro y carbón activado (2,5 g), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite, y el disolvente en el filtrado se evaporó. Al residuo obtenido se añadió hexano (220 ml), y la mezcla se agitó a 50 °C durante 10 min y a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con hexano. El sólido obtenido se secó a presión reducida para dar el compuesto del título (66,9 g). Además, el disolvente en el filtrado obtenido se evaporó, al residuo se añadieron acetato de etilo (5 ml) y hexano (20 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con hexano. El sólido obtenido se secó a presión reducida para proporcionar adicionalmente el compuesto del título (2,5 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,01 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,65-7,61 (2H, m), 7,37 (1H, t, J = 7,6 Hz), 7,17-7,14 (2H, m), 4,13-4,05 (4H, m), 2,47 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,02-1,95 (2H, m), 1,19 (3H, td, J = 7,2, 0,7 Hz).

40

Etapa 6

4-[(9R)-4-Cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-iloxi]butirato de etilo



45

En una atmósfera de argón, se disolvió 4-(4-cloro-9-oxo-9H-fluoren-2-iloxi)butirato de etilo (69,4 g) en THF (700 ml), y se añadió 4-metoxifenóxido de N-(4-terc-butilbencil)cinconidio (6,4 g). A la mezcla de reacción se añadió gota a gota una solución de trimetil(trifluorometil)silano (52,0 ml) en THF (140 ml) a -16 °C, y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 15 min. A la mezcla de reacción se añadieron sucesivamente ácido acético (23,0 ml) y solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M/THF (222 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente en la mezcla de reacción se evaporó, y al residuo obtenido se añadieron tolueno (500 ml) e hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) para permitir la separación de las fases. La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (150 ml, dos veces), hidróxido sódico acuoso 1 N (100 ml), agua (100 ml), ácido clorhídrico 1 N (100 ml), agua (100 ml) y solución salina saturada (100 ml). A la fase orgánica obtenida se añadieron sulfato de magnesio anhidro y gel de sílice (150 g), y la mezcla se agitó durante 10 min. El material insoluble se retiró por filtración, y el material insoluble se lavó sucesivamente con tolueno (300 ml) y acetato de etilo (800 ml). El filtrado obtenido y el lavado con tolueno se combinaron y el disolvente se evaporó para dar el compuesto del título (72,1 g). Además, el disolvente en el lavado de acetato de etilo se evaporó, al residuo obtenido se añadieron gel de sílice (40 g) y un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (acetato de etilo:hexano a 2:1, 300 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. El material insoluble se retiró por filtración, y el material insoluble se lavó con un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (acetato de etilo:hexano = 2:1, 300 ml). El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó para dar adicionalmente el compuesto del título (20,3 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,14 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,53 (1H, t, J = 7,6 Hz), 7,42-7,38 (2H, m), 7,14 (2H, s), 4,11-4,05 (4H, m), 2,47 (2H, t, J = 7,5 Hz), 2,03-1,96 (2H, m), 1,19 (3H, td, J = 7,1, 0,8 Hz).

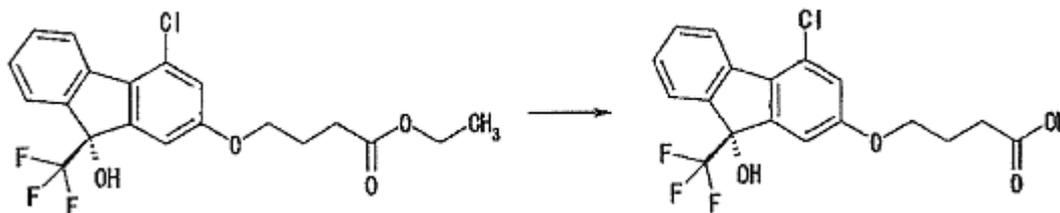
(Configuración absoluta)

La identificación de la configuración absoluta del 4-cloro-2-metil-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol en la etapa 10 que se menciona a continuación confirmó que el compuesto del título obtenido en esta etapa es una forma (R). La pureza óptica era de un 52,9 % con e.e.

La pureza óptica se determinó con la condición 1 de análisis de HPLC. Tiempo de retención de la forma (S) 19,6 min, tiempo de retención de la forma (R) 23,0 min.

Etapa 7

Ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-iloxi]butírico

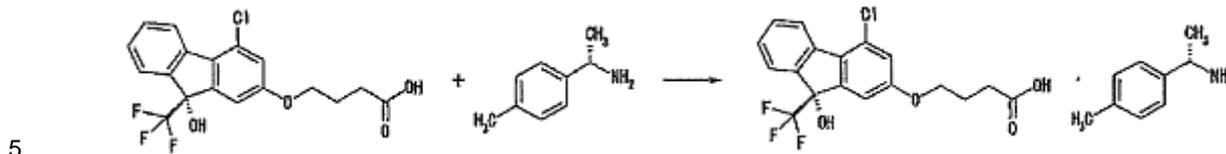


El 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-iloxi]butirato de etilo (92,2 g) se disolvió en etanol (100 ml), se añadió hidróxido sódico acuoso 4 N (100 ml), y la mezcla se agitó a 80 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua (200 ml), y la mezcla se lavó dos veces con tolueno (100 ml). La fase acuosa obtenida se neutralizó con ácido clorhídrico concentrado (40 ml), y se extrajo dos veces con acetato de etilo (300 ml). El extracto de acetato de etilo obtenido se lavó sucesivamente con agua (100 ml, dos veces), y se añadieron solución salina saturada (100 ml), sulfato de magnesio anhidro y carbón activado (4,2 g), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. El material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. Al residuo obtenido se añadió cloroformo (80 ml), y la mezcla se calentó a 50 °C. Se añadió hexano (400 ml) gota a gota, y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min, y a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con un disolvente mixto de hexano y cloroformo (hexano:cloroformo = 9:1, 50 ml), y se secó a presión reducida a 80 °C durante 2 h para dar el compuesto del título (72,5 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 12,17 (1H, s), 8,14 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,54 (1H, td, J = 7,7, 1,2 Hz), 7,42-7,30 (2H, m), 7,18-7,15 (2H, m), 4,09 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,41 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,00-1,93 (2H, m).

Etapa 8

Sal de (1S)-1-(4-metilfenil)etilamina del ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico



En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió (1S)-1-(4-metilfenil)etilamina (19,5 g) en acetato de etilo (720 ml), y se añadió ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico (72,5 g). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h, y a temperatura ambiente durante una noche. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con acetato de etilo (100 ml). El sólido obtenido se secó a presión reducida a 60 °C durante 5 h para dar el compuesto del título (68,6 g). Además, a partir del filtrado se pudo obtener ácido 4-[(9S)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico.

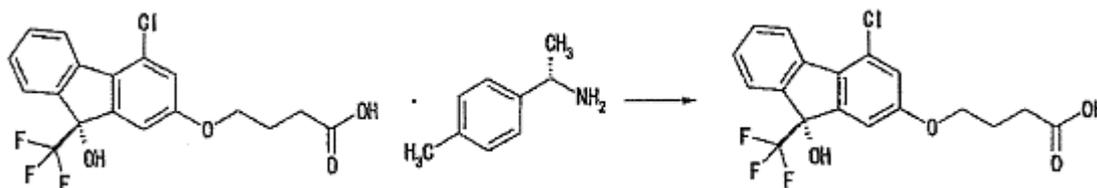
(Pureza óptica)

15 La pureza óptica del ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico se determinó con la condición 1 de análisis de HPLC (pureza óptica de un 90,2 % con e.e.). Tiempo de retención de la forma (R) 12,9 min, tiempo de retención de la forma (S) 10,4 min.

20 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,14 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,53 (1H, td, J = 7,6, 1,1 Hz), 7,40 (1H, td, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,26 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,16-7,10 (4H, m), 4,08 (2H, t, J = 6,5 Hz), 4,01 (1H, c, J = 6,7 Hz), 2,32 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,26 (3H, s), 1,98-1,91 (2H, m), 1,26 (3H, d, J = 6,7 Hz).

Etapa 9

25 Ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico

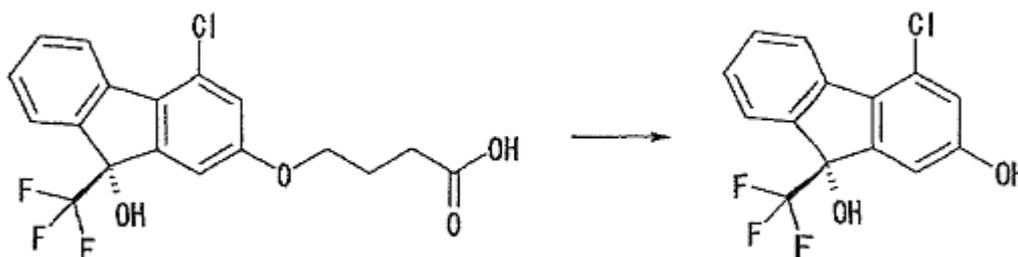


30 A la sal de (1S)-1-(4-metilfenil)etilamina del ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico (68,6 g) se añadieron acetato de etilo (500 ml) y ácido clorhídrico 2 N (300 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se permitió la separación de fases de la mezcla. La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (250 ml) y solución salina saturada (200 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (60,0 g).

35 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 12,17 (1H, s a), 8,14 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,54 (1H, td, J = 7,7, 1,2 Hz), 7,42-7,30 (2H, m), 7,18-7,15 (2H, m), 4,09 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,41 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,00-1,93 (2H, m).

Etapa 10

40 (9R)-4-Cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2,9-diol



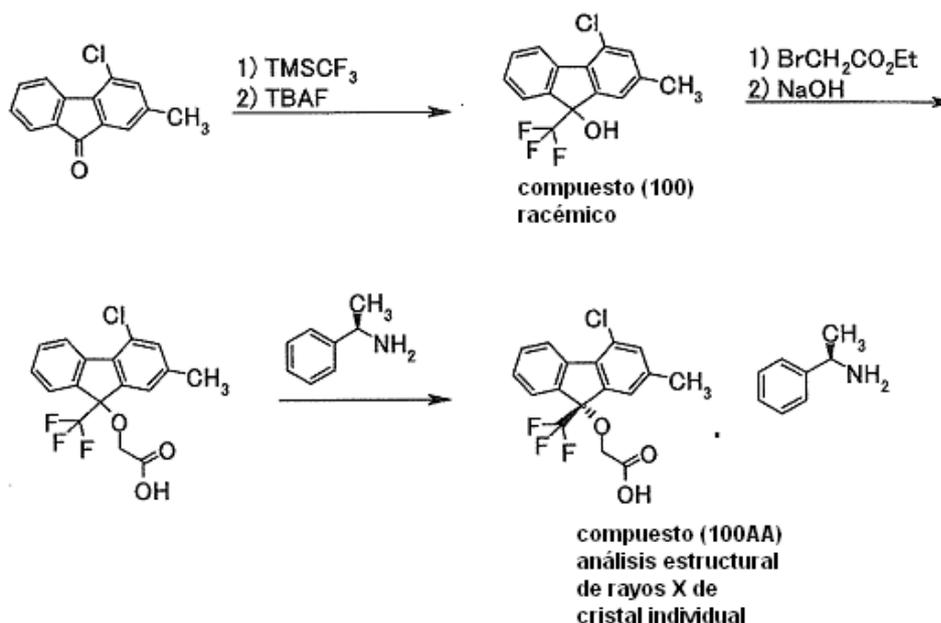
Al ácido 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-ilo]butírico (50 g) se añadieron N-metil-pirrolidona (200 ml) y clorhidrato de piridina (298 g), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 200 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (500 ml), y se lavó dos veces con agua. La fase acuosa obtenida se extrajo de nuevo con acetato de etilo (300 ml). La fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con agua, ácido clorhídrico 1 N y solución salina saturada. A la fase orgánica obtenida se añadieron sulfato de magnesio anhidro y carbón activado (10 g), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite. El disolvente en la fase orgánica obtenida se evaporó, al residuo se le añadió hexano, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se secó a presión reducida a temperatura ambiente. El producto en bruto obtenido se disolvió en acetato de etilo (500 ml), se lavó 3 veces con agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. Al residuo se añadió hexano, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. El sólido precipitado se recogió por filtración, se secó a presión reducida a temperatura ambiente para dar el compuesto del título (22,4 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 10,37 (1H, s a), 8,09 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,63 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,50 (1H, td, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,36 (1H, td, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,32 (1H, s a), 7,06 (1H, s), 6,91 (1H, d a, J = 2,0 Hz).

(Configuración absoluta)

La configuración absoluta del compuesto del título se determinó mediante análisis de HPLC usando la columna ópticamente activa del compuesto (100A) y del compuesto (100B) preparados en las siguientes etapas (Etapa A-1 a Etapa A-2 y Etapa B-1).

Etapa A-1

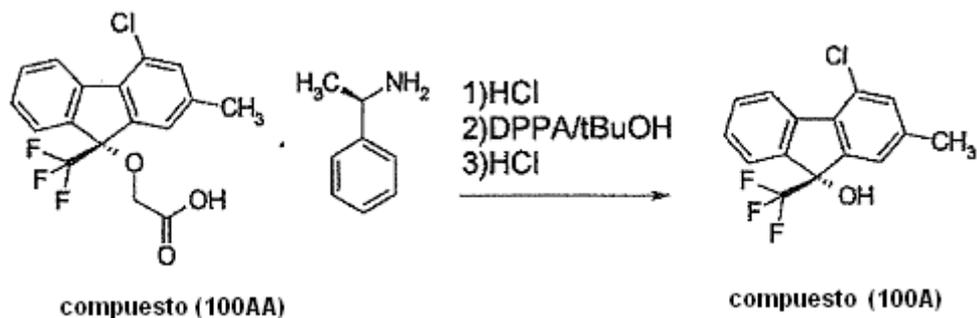


25

La 4-cloro-2-metil-9H-fluoren-9-ona se sometió a trifluorometilación, reacción con bromoacetato de etilo, e hidrólisis para dar ácido [4-cloro-2-metil-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ilo]acético. Este compuesto se resolvió ópticamente usando (1R)-1-feniletilamina, y se determinó que la configuración absoluta era (R) mediante análisis estructural de rayos X de cristal individual de la sal de (1R)-1-feniletilamina (100AA) obtenida.

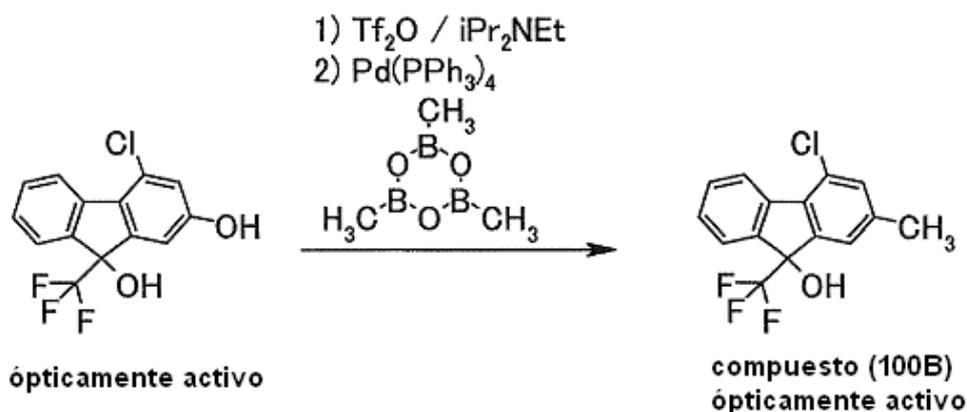
30

Etapa A-2



- 5 El (9R)-4-cloro-2-metil-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol (compuesto (100A)) se sintetizó a partir del compuesto 100AA mediante un tratamiento con ácido, y similares.

Etapa B-1



10

El grupo hidroxilo en la posición 2 del 4-cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2,9-diol obtenido en la etapa 10 se convirtió en un grupo metilo con el método mencionado anteriormente para dar 4-cloro-2-metil-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol (compuesto (100B)).

15

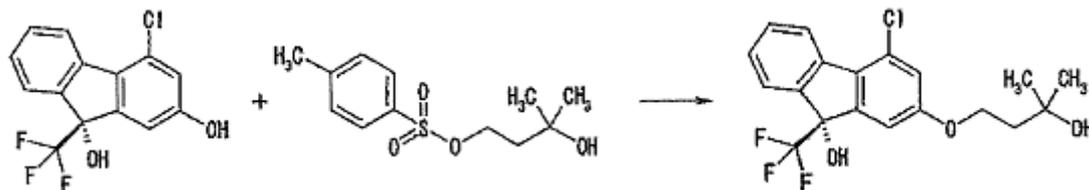
(Análisis de HPLC usando columna ópticamente activa)

20 Ambos enantiómeros del compuesto (100) se separaron por HPLC usando una columna ópticamente activa (condición 3 del análisis de HPLC). El análisis de HPLC del compuesto (100A) confirmó que el tiempo de retención de la forma (R) era 18,4 min, y el tiempo de retención de la forma (S) era 17,0 min. El compuesto (100A) y el compuesto (100B) se analizaron bajo la condición de HPLC para encontrar que el tiempo de retención es equivalente.

25 Se considera que la configuración absoluta del carbono asimétrico no se convierte durante la producción del compuesto (100A) y el compuesto (100B) mencionados anteriormente. Los resultados han confirmado que el 4-cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2,9-diol obtenido en la etapa 10 tiene una configuración absoluta de (R).

Etapa 11

(9R)-4-Cloro-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol



5

En una atmósfera de nitrógeno, el (9R)-4-cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2,9-diol (55,5 g) se disolvió en N,N-dimetilformamida (550 ml), se añadieron tolueno-4-sulfonato de 3-hidroxi-3-metilbutilo (49,6 g) y carbonato potásico (39,5 g), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 70 °C durante una noche. A la mezcla de reacción se añadió una solución de tolueno-4-sulfonato de 3-hidroxi-3-metilbutilo (4,0 g) en N,N-dimetilformamida (5 ml), y la mezcla se agitó adicionalmente a la misma temperatura durante 9,5 h. La mezcla de reacción se enfrió en hielo, se añadió agua (800 ml), y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (900 ml). La fase orgánica obtenida se lavó con agua (500 ml, 3 veces) y solución salina saturada (500 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetato de etilo se usó como un disolvente de elución, eluyendo en primer lugar con una mezcla de (hexano:acetato de etilo) a una proporción de mezcla de 3:1, y a continuación con la mezcla a una proporción de mezcla de 2:1, y adicionalmente con la mezcla a una proporción de mezcla de 3:2) para dar el compuesto del título (49,5 g).

10

15

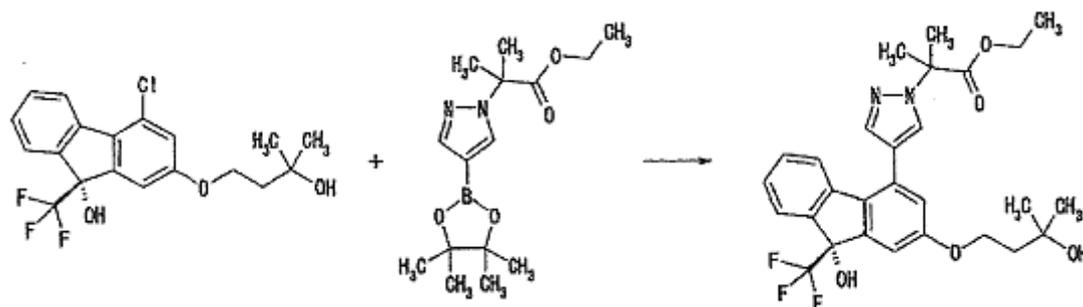
20

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,12 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,64 (1H, d, J = 7,4 Hz), 7,52 (1H, td, J = 7,6, 0,9 Hz), 7,40-7,36 (2H, m), 7,15-7,13 (2H, m), 4,41 (1H, s), 4,16 (2H, t, J = 7,1 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,1 Hz), 1,17 (6H, s).

Etapa 12

2-{4-[(9R)-9-Hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropionato de etilo

25



30

35

40

45

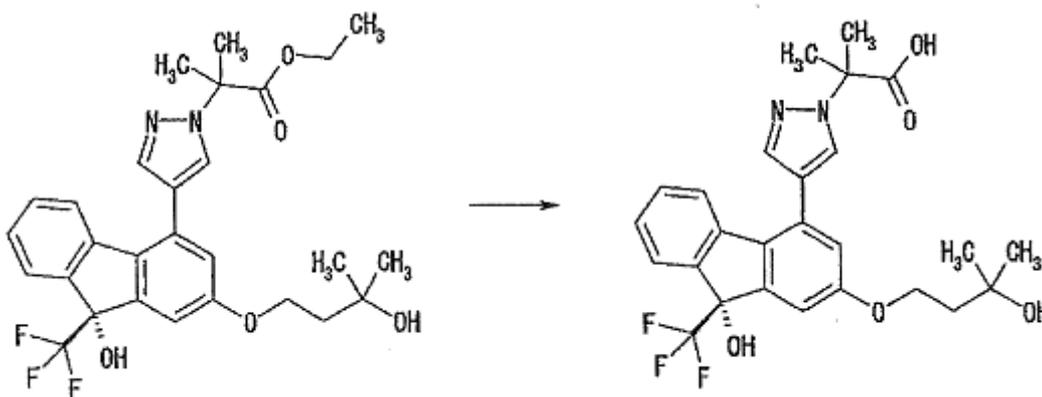
En una atmósfera de argón, el (9R)-4-cloro-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol (49,5 g) se disolvió en tolueno (445 ml), se añadieron 2-metil-2-[4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]propionato de etilo (59,2 g), agua (149 ml), fosfato tripotásico (54,3 g), acetato de paladio (2,9 g) y 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo (SPhos) (10,5 g), y la mezcla se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 100 °C durante 3,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se añadió agua (300 ml). El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite, y el material insoluble se lavó con tolueno (150 ml) y agua (50 ml). Los filtrados obtenidos se combinaron para permitir la separación de las fases. La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (500 ml) y solución salina saturada (500 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetato de etilo se usó como un disolvente de elución, eluyendo en primer lugar con una mezcla de (hexano:acetato de etilo) a una proporción de mezcla de 2:1, y a continuación con la mezcla a una proporción de mezcla de 1:1, y adicionalmente con la mezcla a una proporción de mezcla de 1:2), y se purificó adicionalmente por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetona se usó como un disolvente de elución, eluyendo en primer lugar con una mezcla de (hexano:acetona) a una proporción de mezcla de 2:1, y a continuación con la mezcla a proporciones de mezcla de 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 2:3, y adicionalmente con la mezcla a una proporción de mezcla de 1:2) para dar el compuesto del título (68,4 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,18 (1H, s), 7,65 (1H, s), 7,59-7,57 (1H, m), 7,25-7,21 (4H, m), 7,13 (1H, d, J = 1,6 Hz), 6,84 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,38 (1H, s), 4,16-4,11 (4H, m), 1,86 (2H, t, J = 7,1 Hz), 1,84 (6H, s), 1,16 (6H,

s), 1,13 (3H, t, J = 7,0 Hz).

Etapa 13

- 5 Ácido 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropiónico

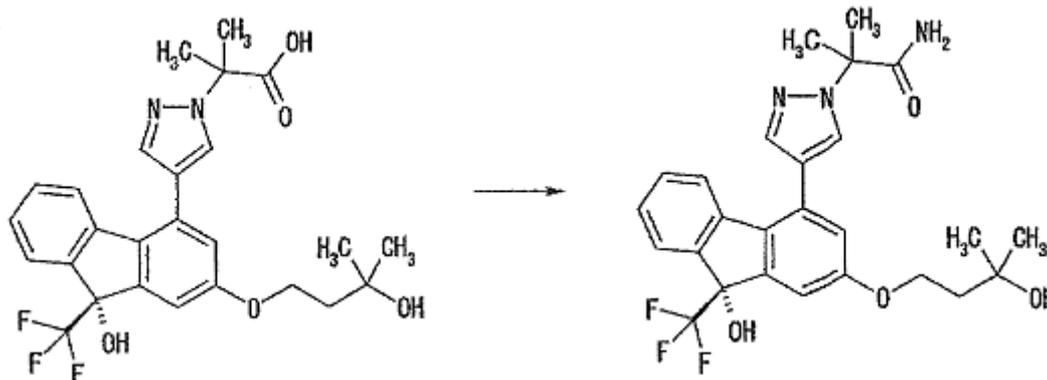


- 10 El 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropionato de etilo (68,4 g) se disolvió en etanol (256 ml), se añadió hidróxido sódico acuoso 4 N (128 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. La mezcla de reacción se enfrió en hielo, se añadió ácido clorhídrico 2 N (333 ml) gota a gota, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (500 ml). La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (400 ml, dos veces) y solución salina saturada (400 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (70,0 g).
- 15 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 13,06 (1H, s a), 8,14 (1H, s), 7,62 (1H, s), 7,57 (1H, dd, J = 6,4, 0,6 Hz), 7,27-7,19 (4H, m), 7,12 (1H, s), 6,84 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,82 (3H, s), 1,81 (3H, s), 1,16 (6H, s).

20 Etapa 14

- 2-{4-[(9R)-9-Hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2))

25

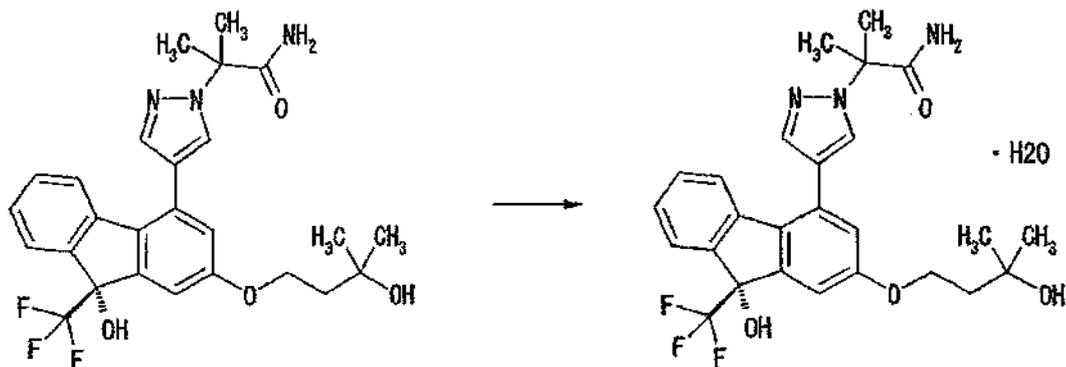


- 30 En una atmósfera de nitrógeno, el ácido 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropiónico (66,7 g) se disolvió en N,N-dimetilformamida (480 ml), se añadieron 1-hidroxidioxibenzotriazol (HOBt) 1 hidrato (27,6 g), clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC) (34,6 g) y amoníaco acuoso al 28 % (24,5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió en hielo, se añadieron agua (630 ml) y ácido clorhídrico 2 N (330 ml) gota a gota, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (800 ml). La fase acuosa obtenida se extrajo de nuevo con acetato de etilo (500 ml). Las fases orgánicas obtenidas se combinaron, y se lavaron sucesivamente con agua (500 ml, dos veces), hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (500 ml), y solución salina saturada (500 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (60,0 g).
- 35

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, s a), 6,96 (1H, s a), 6,87 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

5 Etapa 15

Monohidrato de 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2h))



10

La 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2)) (60,0 g) obtenida en la etapa previa se disolvió en acetato de etilo (109 ml), se añadió agua (2 ml), y la mezcla se calentó a 50 °C. A esta mezcla se añadieron sucesivamente, gota a gota, hexano (226 ml), y un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (hexano:acetato de etilo a 2:1, 150 ml), y la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (hexano:acetato de etilo = 2:1, 180 ml). El sólido obtenido se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante una noche para dar el compuesto del título (52,2 g, pureza óptica de un 98,6 % con e.e.). La pureza óptica se determinó bajo la condición 2 del análisis de HPLC. Tiempo de retención de la forma (R) 11,3 min, tiempo de retención de la forma (S) 13,9 min.

15

20

Rotación óptica específica $[\alpha]_D^{25} +37,9^\circ$ (c = 1,01 MeOH a 25 °C).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, s a), 6,96 (1H, s a), 6,87 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

25

(Medición del análisis elemental)

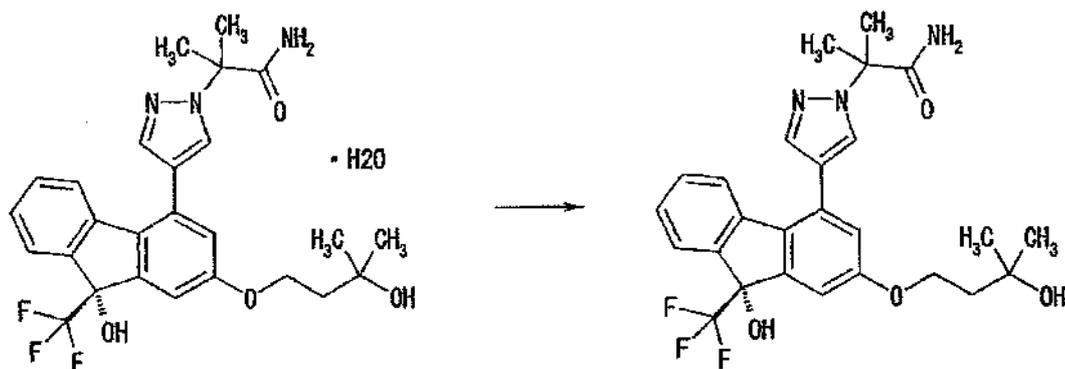
Los resultados del análisis elemental se emparejaban bien con el valor teórico del compuesto (2h) calculado. Calculado: C, 59,88; H, 5,80; N, 8,06 (Calculado como monohidrato) Encontrado: C, 59,86; H, 5,74; N, 8,00.

30

Etapa 16

2-{4-[(9R)-9-Hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2))

35



Al monohidrato de 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (2h)) (22,63 g) obtenido en la etapa previa se añadió tolueno (340 ml). La mezcla de

reacción se agitó en un baño de aceite a una temperatura de 130 °C durante 2 h en una atmósfera de nitrógeno con retirada de agua con un aparato de Dean-Stark. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente en un baño de aceite a una temperatura de 70 °C durante 1,5 h, se permitió que enfriara a temperatura ambiente, y se agitó durante una noche. El sólido precipitado se recogió por filtración, y se lavó con tolueno (100 ml). El sólido obtenido se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante 3 días, y se secó adicionalmente a presión reducida a 60 °C durante 1 día para dar el compuesto del título (21,5 g).

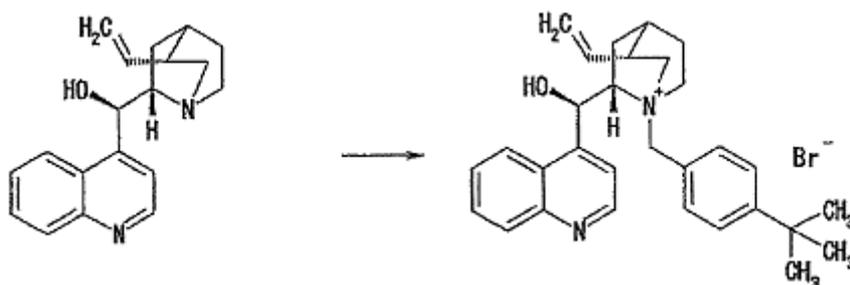
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, s a), 6,96 (1H, s a), 6,87 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

(Medición del análisis elemental)

Los resultados del análisis elemental se emparejaban bien con el valor teórico del compuesto (2) calculado. Calculado: C, 62,02; H, 5,61; N, 8,35 (Calculado como anhidro) Encontrado: C, 62,17; H, 5,60; N, 8,47.

Etapa C-1

Preparación de bromuro de N-(4-terc-butilbencil)cinconidio

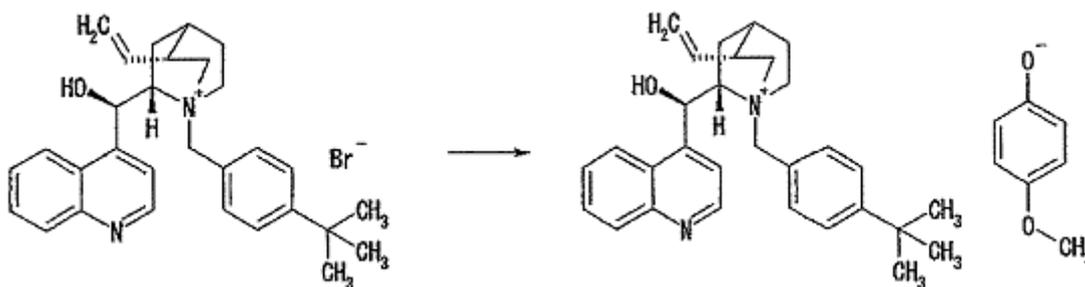


La cinconidina (10,6 g) se disolvió en tetrahidrofurano (200 ml), se añadieron bromuro de 4-terc-butilbencilo (10,1 g) y yoduro de tetrabutilamonio (0,66 g), y la mezcla se agitó a 70 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, el sólido se recogió por filtración, y se lavó con acetato de etilo (50 ml). El sólido obtenido se secó a presión reducida durante una noche para dar el compuesto del título (18,5 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,99 (1H, d, J = 4,4 Hz), 8,27 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,11 (1H, dd, J = 8,5, 1,0 Hz), 7,89-7,79 (2H, m), 7,78-7,71 (1H, m), 7,63 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,59 (2H, t, J = 8,4 Hz), 6,72 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,57-6,51 (1H, s a), 5,67 (1H, ddd, J = 17,0, 10,4, 6,4 Hz), 5,14 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,08 (1H, d, J = 12,6 Hz), 5,00-4,90 (2H, m), 4,30-4,18 (1H, m), 3,91 (1H, t, J = 8,7 Hz), 3,74-3,64 (1H, m), 3,35-3,18 (2H, m), 2,76-2,65 (1H, m), 2,18-1,94 (3H, m), 1,90-1,78 (1H, m), 1,40-1,22 (1H, m), 1,34 (9H, s).

Etapa C-2

Preparación de 4-metoxifenóxido de N-(4-terc-butilbencil)cinconidio

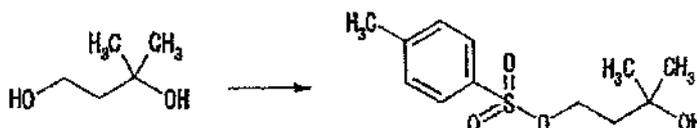


Se añadieron bromuro de N-(4-terc-butilbencil)cinconidio (18,5 g), AMBERLYST (marca comercial registrada) A26 (resina de intercambio iónico básica fuerte de estireno, matriz de divinilbenceno) (18,5 g) y metanol (280 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El material insoluble se retiró por filtración a través de Celite, y se lavó con metanol (100 ml). Al filtrado se añadió 4-metoxifenol (4,8 g), y el disolvente se evaporó. El residuo se evaporó por vía azeotrópica 3 veces con tolueno (100 ml), y se añadió tolueno (20 ml). A continuación, se éter diisopropílico (200 ml) gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter diisopropílico (50 ml) y la mezcla se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante una noche para dar el compuesto del título (21,8 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) δ: 8,91 (1H, d, J = 4,4 Hz), 8,17 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,89 (1H, d, J = 4,4 Hz), 7,79 (1H, t, J = 7,6 Hz), 7,64 (1H, t, J = 7,5 Hz), 7,57-7,52 (5H, m), 6,56-6,55 (2H, m), 6,43-6,42 (3H, m), 5,67-5,59 (1H, m), 5,28 (1H, d, J = 12,1 Hz), 5,12 (1H, d, J = 17,2 Hz), 4,92 (1H, d, J = 10,6 Hz), 4,84 (1H, d, J = 12,1 Hz), 4,65-4,53 (1H, m), 3,80 (1H, t, J = 8,8 Hz), 3,65-3,63 (1H, m), 3,57 (3H, s), 3,25 (1H, t, J = 11,6 Hz), 3,10-3,07 (1H, m), 2,67 (1H, s a), 2,07-2,02 (2H, m), 1,95 (1H, s a), 1,79-1,76 (1H, m a), 1,33 (9H, s), 1,16-1,11 (1H, m).

Etapa D

- 10 Preparación de tolueno-4-sulfonato de 3-hidroxi-3-metilbutilo



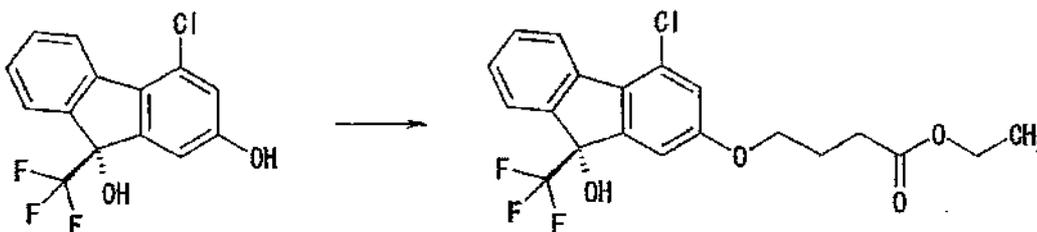
- 15 En una atmósfera de nitrógeno, el 3-metilbutano-1,3-diol (300 g) se disolvió en piridina (900 ml), y se añadió una solución de cloruro de 4-metilbencenosulfonilo (500 g) en tolueno (900 ml) y acetonitrilo (125 ml) gota a gota durante 2 h. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, y se añadieron tolueno (500 ml) y agua (1800 ml) para permitir la separación de las fases. La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con ácido sulfúrico acuoso y agua (dos veces). El disolvente en la fase orgánica obtenida se evaporó, y el residuo se evaporó por vía azeotrópica con tolueno (500 ml) para dar el compuesto del título (535 g).
- 20 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,81-7,76 (2H, m), 7,36-7,31 (2H, m), 4,20 (2H, td, J = 6,8, 1,6 Hz), 2,44 (3H, s), 1,85 (2H, td, J = 6,8, 1,6 Hz), 1,33 (1H, s), 1,21 (6H, s).

Ejemplo 2

- 25 **Síntesis de 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (3))**

Etapa 1

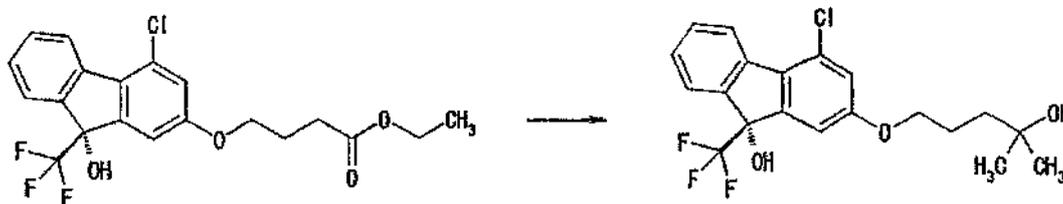
- 30 4-[(9R)-4-Cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-iloxi]butirato de etilo



- 35 El (9R)-4-Cloro-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2,9-diol (200 mg) obtenido en la etapa 10 del ejemplo 1 se disolvió en N,N-dimetilformamida (2 ml), se añadieron carbonato potásico (185 mg) y 4-bromobutirato de etilo (105 μl), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 h. A la mezcla de reacción se añadió agua, y la mezcla se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada. La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetato de etilo se usó como un disolvente de elución, eluyendo en primer lugar con una mezcla a una proporción de mezcla de 5:1 (hexano:acetato de etilo), a continuación sucesivamente con una mezcla a una proporción de mezcla de 3:1, y adicionalmente con una mezcla a una proporción de mezcla de 2:1) para dar el compuesto del título (197 mg).
- 40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,19 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,46 (1H, td, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,32 (1H, td, J = 7,6, 1,0 Hz), 7,16 (1H, s a), 6,93 (1H, d, J = 2,1 Hz), 4,14 (2H, c, J = 7,1 Hz), 4,05 (2H, t, J = 7,1 Hz), 2,82 (1H, s), 2,50 (2H, t, J = 7,1 Hz), 2,15-2,06 (2H, m), 1,25 (3H, t, J = 7,1 Hz).
- 45

Etapa 2

(9R)-4-Cloro-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol



5

En una atmósfera de nitrógeno, el 4-[(9R)-4-cloro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-2-il]butirato de etilo (197 mg) se disolvió en THF (2 ml), y se añadió solución de metil-litio/éter dietílico (1,07 M, 2,2 ml) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 h, se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (dos veces). La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada. La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetato de etilo se usó como un disolvente de elución, eluyendo en primer lugar con una mezcla a una proporción de mezcla de 3:1 (hexano:acetato de etilo), a continuación con una mezcla a una proporción de mezcla de 2:1) para dar el compuesto del título (169 mg).

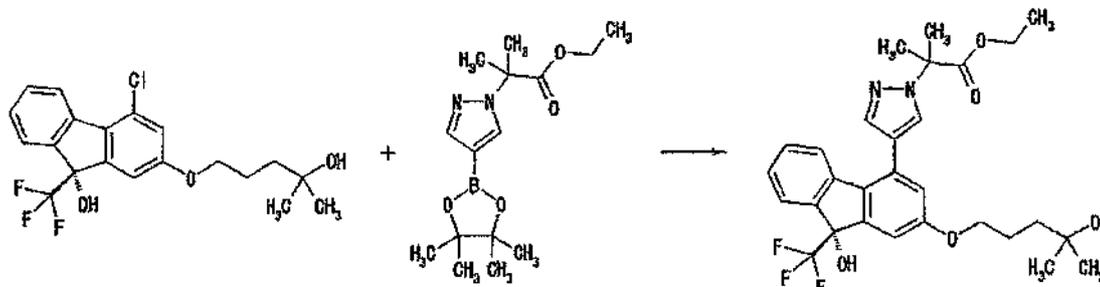
10

15

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,19 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,47 (1H, td, J = 7,7, 1,0 Hz), 7,32 (1H, td, J = 7,7, 1,0 Hz), 7,17 (1H, s a), 6,93 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,02 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,82 (1H, s), 1,92-1,85 (2H, m), 1,65-1,62 (2H, m), 1,26 (3H, s), 1,25 (3H, s).

20 Etapa 3

2-{4-[(9R)-9-Hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropionato de etilo



25

En una atmósfera de argón, el (9R)-4-cloro-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol (169 mg) se disolvió en 1,4-dioxano (1,5 ml), se añadieron 2-metil-2-[4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]propionato de etilo (194 mg), agua (0,5 ml), fosfato tripotásico (178 mg), acetato de paladio (9 mg), y SPhos (33 mg), y la mezcla se agitó a 100 °C durante 4,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (dos veces). La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada. La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (una mezcla de hexano y acetato de etilo a una proporción de mezcla de 1:1 (hexano:acetato de etilo) se usó como un disolvente de elución) para dar el compuesto del título (218 mg).

30

35

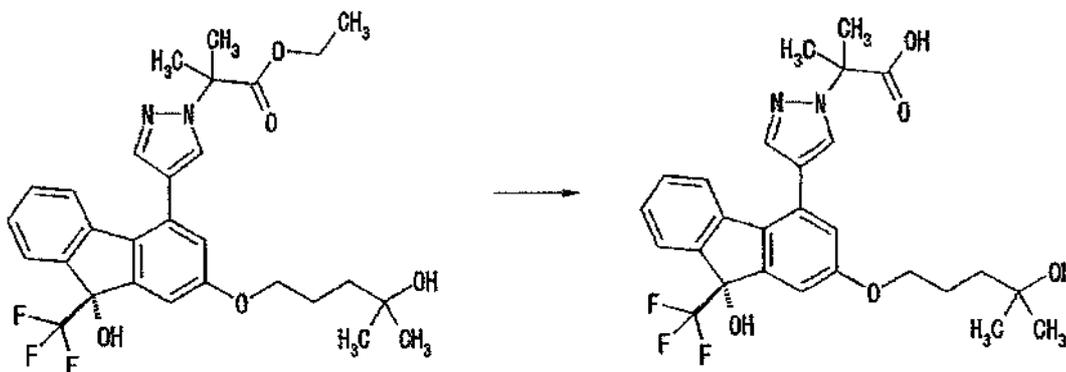
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,69 (1H, s), 7,63-7,62 (2H, m), 7,21-7,19 (4H, m), 6,81 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,21 (2H, c, J = 7,1 Hz), 4,04 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,82 (1H, s), 1,92 (3H, s), 1,91 (3H, s), 1,89-1,88 (2H, m), 1,66-1,64 (2H, m), 1,26 (6H, s), 1,26-1,23 (3H, m).

40

Etapa 4

Ácido 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropiónico

5



El 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropionato de etilo (218 mg) se disolvió en etanol (2,2 ml), se añadió hidróxido sódico acuoso 4 N (320 μ l), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido clorhídrico 1 N, y se extrajo con acetato de etilo (dos veces). La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada. La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (179 mg).

10

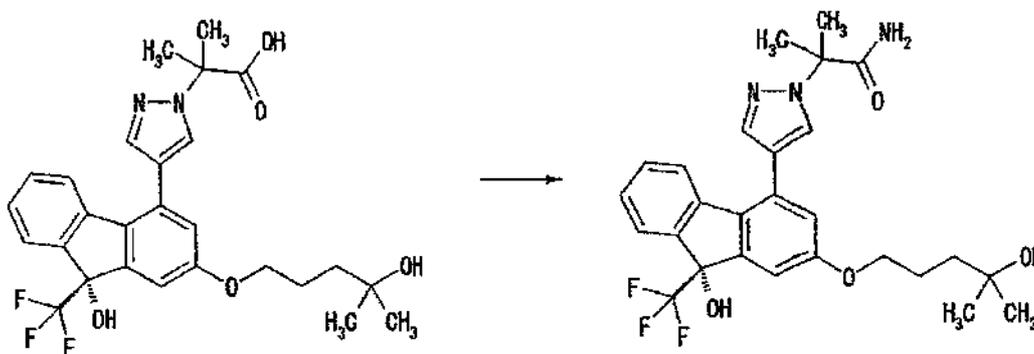
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,73 (1H, s), 7,68 (1H, s), 7,63-7,62 (1H, m), 7,23-7,09 (4H, m), 6,78 (1H, d, J = 2,6 Hz), 4,02 (2H, t, J = 6,3 Hz), 1,93 (6H, s), 1,89-1,86 (2H, m), 1,65-1,61 (2H, m), 1,25 (6H, s).

15

Etapa 5

2-{4-[(9R)-9-Hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida (compuesto (3))

20



En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió ácido 2-{4-[(9R)-9-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentiloxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropiónico (89 mg) en N,N-dimetilformamida (1 ml), se añadieron cloruro de amonio (28 mg), N,N-diisopropiletilamina (148 μ l) y hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metil]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilo (HATU) (99 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la mezcla de reacción se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (dos veces). La fase orgánica obtenida se lavó sucesivamente con solución salina saturada diluida (dos veces) y solución salina saturada. La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el material insoluble se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (una mezcla de cloroformo y metanol a una proporción de mezcla de 9:1 (cloroformo:metanol) se usó como un disolvente de elución) para dar el compuesto del título (48 mg, pureza óptica de un 96,9 % con e.e.). La pureza óptica se determinó bajo la condición 2 del análisis de HPLC. Tiempo de retención de la forma (R) 13,0 min, tiempo de retención de la forma (S) 14,4 min.

25

30

35

Rotación óptica específica $[\alpha]_D^{25} +37,5^\circ$ (c = 1,04 MeOH a 25 $^\circ\text{C}$).

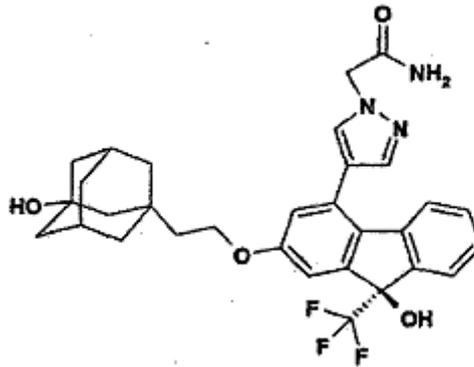
RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8,07 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,57-7,55 (1H, m), 7,34-7,31 (1H, m), 7,24-7,23 (3H, m), 7,18 (1H, s), 7,11 (1H, s a), 6,94 (1H, s a), 6,86 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,16 (1H, s), 4,03 (2H, t, J = 6,5 Hz), 1,80 (3H, s), 1,79 (3H, s), 1,80-1,75 (2H, m), 1,51-1,47 (2H, m), 1,11 (6H, s).

(Ejemplo de Preparación de cristal del compuesto (3))

Al compuesto (3) (40 mg) sintetizado con las etapas de ejemplo mencionado anteriormente se añadió una mezcla de MeOH y agua (proporción de volumen de 1:3 (0,5 ml)). A continuación, a esta solución se le añadió un cristal (0,5 mg) del compuesto (2h) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El sólido precipitado se recogió por filtración para dar un cristal (41 mg) del compuesto (3).

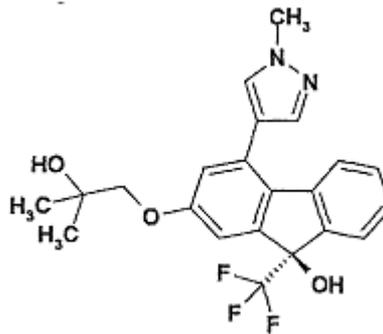
(Preparación de los compuestos (A), (B), (C) y (D); no incluidos en el alcance de las reivindicaciones)

10 Cada uno del compuesto (A), el compuesto (B), el compuesto (C) y el compuesto (D), que se representan con las siguientes fórmulas, se obtuvieron como una forma ópticamente activa de acuerdo con el método de producción que se describe en el documento WO 2010/041748.



15
Compuesto (A)

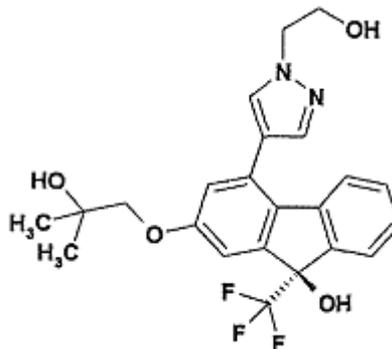
2-(4-((9R)-9-Hidroxi-2-[2-(3-hidroxiadamantan-1-il)etoxi]-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il)-1H-pirazol-1-il)acetamida



20
Compuesto (B)

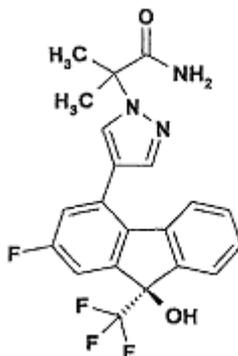
(9R)-2-(2-Hidroxi-2-metilpropoxi)-4-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol

25



Compuesto (C)

(9R)-4-[1-(2-Hidroxietil)-1H-pirazol-4-il]-2-(2-hidroxi-2-metilpropoxi)-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-9-ol



5

Compuesto (D)

2-{4-[(9R)-2-Fluoro-9-hidroxi-9-(trifluorometil)-9H-fluoren-4-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida

10

Como un Ejemplo de Formulación de la presente invención, se puede mencionar la siguiente preparación. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estos Ejemplos de Formulación.

Ejemplo de Formulación 1 (producción de cápsula)

15

- 1) compuesto del Ejemplo 1 (compuesto (2)) 30 mg
- 2) celulosa microcristalina 10 mg
- 3) lactosa 19 mg
- 4) estearato de magnesio 1 mg

20

1), 2), 3) y 4) se mezclan y se cargan en una cápsula de gelatina.

Ejemplo de Formulación 2 (producción de comprimido)

25

- 1) compuesto del Ejemplo 1 (compuesto (2)) 10 g
- 2) lactosa 50 g
- 3) almidón de maíz 15 g
- 4) carmelosa cálcica 44 g
- 5) estearato de magnesio 1 g

30

La cantidad total de 1), 2), 3) y 30 g de 4) se amasa con agua, se seca al vacío, y se tamiza. El polvo tamizado se mezcla con 14 g de 4) y 1 g de 5), y la mezcla se troquela con una máquina de preparación de comprimidos. De este modo, se obtienen 1000 comprimidos cada uno conteniendo 10 mg del compuesto del Ejemplo 1 (compuesto (2)) por comprimido.

35

Ejemplo Experimental 1: Acción inhibitoria de la actividad de PDHK *in vitro*

La acción inhibitoria de la actividad de PDHK se evaluó indirectamente midiendo la actividad de PDH residual después de reacción de quinasa en presencia de un compuesto de ensayo.

40

(Acción inhibitoria de la actividad de PDHK1)

En el caso de PDHK1 humana (hPDHK1, registro en Genbank N.º L42450.1), un fragmento de 1,3 kpb que codificaba esta proteína se aisló del ADNc de hígado humano mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADNc de hPDHK1 modificado en el que la secuencia de FLAG-Etiqueta se añadió al extremo N terminal se preparó mediante PCR y se clonó en un vector (pET17b-Novagen). La construcción recombinante se transformó en *Escherichia coli* (DH5α-TOYOBO). Los clones recombinantes se identificaron, y el ADN de plásmido se aisló y se sometió al análisis de secuencias de ADN. Un clon que presentaba la secuencia de ácidos nucleicos esperada se seleccionó para trabajo de expresión.

50

Para expresión de actividad de hPDHK1, se transformaron células de la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* (Novagen) con el vector pET17b que contenía ADNc de hPDHK1 modificado. La *Escherichia coli* se cultivó hasta

una densidad óptica de 0,6 (600 nmol/l) a 30 °C. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de 500 µmol/l de isopropil-β-tiogalactopiranosido. La *Escherichia coli* cultivó a 30 °C durante 5 h y se recogió mediante centrifugación. La nueva suspensión de la pasta de *Escherichia coli* se interrumpió con un microfluidizador. La proteína etiquetada con FLAG se purificó usando gel de afinidad por FLAG (Sigma).

5 El gel se lavó con 20 mmol/l de ácido N-(2-hidroxi)etil)piperazina-N'-2-etanosulfónico-hidróxido sódico (HEPES-NaOH), 500 mmol/l de cloruro sódico, etilenglicol al 1 %, y un 0,1 % de copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic F-68, pH 8,0), y la proteína de unión se eluyó con 20 mmol/l de HEPES-NaOH, 100 µg/ml de péptido FLAG, 500 mmol/l de cloruro sódico, etilenglicol al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 % (pH 8,0).

10 Las fracciones eluidas que contenían la proteína etiquetada con FLAG se combinaron, se dializaron contra 20 mmol/l de HEPES-NaOH, 150 mmol/l de cloruro sódico, 0,5 mmol/l de ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), etilenglicol al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 % (pH 8,0), y se conservaron a -80 °C. Después del ensayo, la concentración de la enzima hPDHK1 se estableció en una concentración mínima que proporcionaba una inhibición de aproximadamente un 90 % de la actividad de PDH.

15 Se mezclaron 0,05 U/ml de PDH (complejo de PDH de corazón porcino, Sigma P7032) y 1,0 µg/ml de hPDHK1 en un tampón (50 mmol/l de ácido 3-morfolinopropano sulfónico (pH 7,0), 20 mmol/l de hidrogenofosfato dipotásico, 60 mmol/l de cloruro potásico, 2 mmol/l de cloruro de magnesio, 0,4 mmol/l de EDTA, Pluronic F-68 al 0,2 %, 2 mmol/l de ditiotreitól), y la mezcla se incubó a 4 °C durante una noche para obtener un complejo de PDH/hPDHK1.

20 Los compuestos de ensayo se diluyeron con dimetilsulfóxido (DMSO). El complejo de PDH/hPDHK1 (20 µl), el compuesto de ensayo (1,5 µl) y 3,53 µmol/l de ATP (diluido con tampón, 8,5 µl) se añadieron a una microplaca transparente a UV de 96 pocillos de área media (Corning 3679), y la reacción de PDHK se realizó a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadió DMSO (1,5 µl) a los pocillos de control en lugar del compuesto de ensayo. Para determinar la tasa máxima de la reacción de PDH, se añadió DMSO (1,5 µl) a pocillos de blanco en lugar del compuesto de ensayo en ausencia de hPDHK1.

25 A continuación, se añadieron 10 µl de sustrato (5 mmol/l de piruvato sódico, 5 mmol/l de Coenzima A, 12 mmol/l de NAD, 5 mmol/l de pirofosfato de tiamina, diluido con tampón). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 90 min, y la actividad de PDH residual se midió.

30 La absorbancia a 340 nm antes y después de la reacción de PDH se midió usando un lector de microplacas para detectar el NADH producido por la reacción de PDH. La tasa de inhibición de hPDHK1 (%) del compuesto de ensayo se calculó a partir de la fórmula $\left[\frac{\text{actividad de PDH del compuesto de ensayo} - \text{actividad de PDH del control}}{\text{actividad de PDH del blanco} - \text{actividad de PDH del control}} \right] \times 100$. El valor de CI_{50} se calculó a partir de las concentraciones del compuesto de ensayo en dos puntos que incluían un 50 % de inhibición de la actividad de hPDHK1.

35 Los resultados obtenidos usando el compuesto (2), el compuesto (2h) y el compuesto (3) como compuestos de ensayo se muestran en la Tabla 1 que sigue a continuación.

(Acción inhibitoria de la actividad de PDHK2)

40 En el caso de PDHK2 humana (hPDHK2, registro en Genbank N.º BC040478.1), el ADNc de hPDHK2 modificada en el que se añadió la secuencia etiquetada con FLAG al extremo N terminal del clon de ADNc de hPDHK2 (pReceiver-M01/PDK2-GeneCopoeia) se preparó por PCR y se clonó en un vector (pET17b-Novagen). La construcción recombinante se transformó en *Escherichia coli* (DH5α-TOYOBO). Los clones recombinantes se identificaron, y el ADN de plásmido se aisló y se sometió al análisis de secuencias de ADN. Un clon que presentaba la secuencia de ácidos nucleicos esperada se seleccionó para trabajo de expresión.

45 Para expresión de actividad de hPDHK2, se transformaron células de la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* (Novagen) con el vector pET17b que contenía ADNc de hPDHK2 modificado. La *Escherichia coli* se cultivó hasta una densidad óptica de 0,6 (600 nmol/l) a 30 °C. P La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de 500 µmol/l de isopropil-β-tiogalactopiranosido. La *Escherichia coli* cultivó a 30 °C durante 5 h y se recogió mediante centrifugación. La nueva suspensión de la pasta de *Escherichia coli* se interrumpió con un microfluidizador. La proteína etiquetada con FLAG se purificó usando gel de afinidad por FLAG. El gel se lavó con 20 mmol/l de HEPES-NaOH, 500 mmol/l de cloruro sódico, etilenglicol al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 % (pH 8,0), y la proteína de unión se eluyó con 20 mmol/l de HEPES-NaOH, 100 µg/ml de péptido FLAG, 500 mmol/l de cloruro sódico, etilenglicol al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 % (pH 8,0). Las fracciones eluidas que contenían la proteína etiquetada con FLAG se combinaron, se dializaron contra 20 mmol/l de HEPES-NaOH, 150 mmol/l de cloruro sódico, 0,5 mmol/l de EDTA, etilenglicol al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 % (pH 8,0), y se conservaron a -80 °C. Después del ensayo, la concentración de la enzima hPDHK2 se estableció en una concentración mínima que proporcionaba una inhibición de aproximadamente un 90 % de la actividad de PDH.

65

Se mezclaron 0,05 U/ml de PDH y 0,8 µg/ml de hPDHK2 en un tampón (50 mmol/l de ácido 3-morfolinopropano sulfónico (pH 7,0), 20 mmol/l de hidrogenofosfato dipotásico, 60 mmol/l de cloruro potásico, 2 mmol/l de cloruro de magnesio, 0,4 mmol/l de EDTA, y Pluronic F-68 al 0,2 %, 2 mmol/l de ditioneitol), y la mezcla se incubó a 4 °C durante una noche para obtener un complejo de PDH/hPDHK2. Los compuestos de ensayo se diluyeron con DMSO.

5 El complejo de PDH/hPDHK2 (20 µl), el compuesto de ensayo (1,5 µl) y 3,53 µmol/l de ATP (diluido con tampón, 8,5 µl) se añadieron a una microplaca transparente a UV de 96 pocillos de área media, y la reacción de PDHK se realizó a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadió DMSO (1,5 µl) a los pocillos de control en lugar del compuesto de ensayo. Para determinar la tasa máxima de la reacción de PDH, se añadió DMSO (1,5 µl) a pocillos de blanco en lugar del compuesto de ensayo en ausencia de hPDHK2. A continuación, se añadieron 10 µl de sustratos (5 mmol/l de piruvato sódico, 5 mmol/l de Coenzima A, 12 mmol/l de NAD, 5 mmol/l de pirofosfato de tiamina, diluido con tampón). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 90 min, y la actividad de PDH residual se midió. La absorbancia a 340 nm antes y después de la reacción de PDH se midió usando un lector de microplacas para detectar el NADH producido por la reacción de PDH. La tasa de inhibición de hPDHK2 (%) del compuesto de ensayo se calculó a partir de la fórmula $[(\text{actividad de PDH del compuesto de ensayo} - \text{actividad de PDH del control}) / \text{actividad de PDH del blanco} - \text{actividad de PDH del control}] \times 100$. El valor de CI_{50} se calculó a partir de las concentraciones del compuesto de ensayo en dos puntos que incluían un 50 % de inhibición de la actividad de hPDHK2.

20 Los resultados obtenidos usando el compuesto (2), el compuesto (2h), el compuesto (3), el compuesto (A), el compuesto (B), el compuesto (C) y el compuesto (D) como compuestos de ensayo se muestran en la Tabla 1 que sigue a continuación.

[Tabla 1]

Compuesto	CI_{50} de hPDHK1 (µmol/l)	CI_{50} de hPDHK2 (µmol/l)
Compuesto (2)	0,0047	0,0046
Compuesto (2h)	0,0066	0,0049
Compuesto (3)	0,0035	0,0042
Compuesto (A)	- (no sometido a ensayo)	0,0051
Compuesto (B)	- (no sometido a ensayo)	0,0074
Compuesto (C)	- (no sometido a ensayo)	0,0067
Compuesto (D)	- (no sometido a ensayo)	0,0051

25 Ejemplo Experimental 2: Ensayo de activación de PDH *ex vivo*

(Método experimental)

30 Se evaluó la acción del compuesto de ensayo en la actividad de PDH de tejido. La producción de NADH se detectó a través de sistema acoplado a violeta de p-yodonitrotetrazolio (INT) para medir la actividad de PDH.

35 Las ratas Sprague-Dawley macho normales se asignaron de forma aleatoria al grupo de vehículo y los grupos de compuestos de ensayo. El vehículo (solución de metilcelulosa acuosa al 0,5 %, 5 ml/kg) o el compuesto de ensayo se administró por vía oral a las ratas. A las 5 o 20 h después de la administración, las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg), y se recogieron cortes de hígado y tejidos adiposos de epidídimo.

40 A los cortes de hígado se le añadieron rápidamente 9 volúmenes de tampón de homogeneización enfriado con hielo (0,25 mol/l de sacarosa, 5 mmol/l de clorhidrato de tris(hidroxi metil)aminometano (pH 7,5), 2 mmol/l de EDTA), y las mezclas se homogeneizaron usando un homogeneizador Polytron. Los homogenados se centrifugaron a 600 x g, 4 °C durante 10 min para obtener el sobrenadante. Los sobrenadantes (1 ml) se centrifugaron a 16.000 x g, 4 °C durante 10 min para recoger los precipitados. Los precipitados se lavaron mediante resuspensión en el tampón de homogeneización (1 ml) y se centrifugaron de la misma manera. Los precipitados se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C como la fracción mitocondrial de hígado.

45 A los tejidos adiposos se le añadieron rápidamente 3 volúmenes de un tampón de homogeneización enfriado con hielo, y las mezclas se homogeneizaron usando un homogeneizador Polytron. Los homogenados se centrifugaron a 600 x g, 4 °C durante 10 min para obtener el sobrenadante. Los sobrenadantes se centrifugaron a 16.000 x g, 4 °C durante 10 min para recoger los precipitados. Los precipitados se lavaron mediante resuspensión en el tampón de homogeneización (1 ml) y se centrifugaron de la misma manera. Los precipitados se congelaron con nitrógeno

líquido y se almacenaron a -80 °C como la fracción mitocondrial de tejido adiposo.

Las fracciones mitocondriales se descongelaron y se suspendieron con el tampón de muestra (0,25 mol/l de sacarosa, 20 mmol/l de clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (pH 7,5), 50 mmol/l de cloruro potásico, y 1 ml/l de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton X-100)). La actividad de PDH activa (actividad de PDHa) y la actividad de PDH total (actividad de PDHt) se midieron para evaluar la actividad de PDH. Para la medición de la actividad de PDHt, se mezclaron cantidades iguales de la suspensión mitocondrial y el tampón de activación (0,25 mol/l de sacarosa, 20 mmol/l de clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (pH 7,5), 50 mmol/l de cloruro potásico, 1 ml/l de Triton X-100, 4 mmol/l de cloruro cálcico, 40 mmol/l de cloruro de magnesio, 10 mmol/l de dicloroacetato sódico), y la mezclas se incubaron a 37 °C durante 10 min. Cuarenta microlitros de las suspensiones mitocondriales diluidas con un tampón de muestra se añadieron a una microplaca de 96 pocillos para medición de la actividad y medición del blanco. A continuación, se añadieron 180 µl de la mezcla de reacción (0,056 mmol/l de tampón de fosfato potásico (pH 7,5), 5,6 mmol/l de DL-carnitina, 2,8 mmol/l de NAD, 0,22 mmol/l de pirofosfato de tiamina, 0,11 mmol/l de Coenzima A, 1,1 ml/l de Triton X-100, 1,1 mmol/l de cloruro de magnesio, 1,1 g/l de albúmina de suero bovino, 0,67 mmol/l de INT, 7,2 µmol/l de metosulfato de fenazina, 28 mmol/l de oxamato sódico) a cada pocillo, ya continuación se añadieron 20 µl de 50 mmol/l de piruvato sódico a la medición de la actividad o agua para medición del blanco. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente con sombreado. Las absorbancias a 500-750 nm, que se podían atribuir a la reducción de INT, el aceptor de electrones final, se midieron usando un lector de microplacas en el tiempo y se calcularon los cambios en la absorbancia. La actividad de PDH se calculó restando el cambio en la absorbancia del pocillo de blanco del pocillo de medición de la actividad. El porcentaje de la actividad de PDHa con respecto a la actividad de PDHt se calculó y se tomó como un índice de la activación de PDH.

Los resultados obtenidos usando el compuesto (2h), el compuesto (3), el compuesto (A), el compuesto (B), el compuesto (C) y el compuesto (D) como compuestos de ensayo se muestran en la Tabla 2 que sigue a continuación, Fig. 1 (Hígado) y Fig. 2 (Tejido adiposo). Además, los resultados obtenidos usando el compuesto (2) se muestran en la Tabla 3 que sigue a continuación.

[Tabla 2]

Compuesto	Actividad de PDHa (% de actividad de PDHt)							
	Hígado				Tejido adiposo			
	5 h		20 h		5 h		20 h	
	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg
Compuesto (2h)	13 ± 3	59 ± 6	13 ± 3	31 ± 5	31 ± 10	59 ± 2	31 ± 10	44 ± 12
Compuesto (3)	13 ± 3	56 ± 8	13 ± 3	32 ± 9	31 ± 10	70 ± 9	31 ± 10	42 ± 3
Compuesto (A)	13 ± 3	35 ± 6	13 ± 3	16 ± 10	31 ± 10	32 ± 14	31 ± 10	24 ± 7
Compuesto (B)	13 ± 3	43 ± 7	13 ± 3	10 ± 3	31 ± 10	59 ± 5	31 ± 10	30 ± 4
Compuesto (C)	13 ± 3	44 ± 5	13 ± 3	13 ± 3	31 ± 10	53 ± 4	31 ± 10	28 ± 7
Compuesto (D)	13 ± 3	41 ± 15	13 ± 3	20 ± 1	31 ± 10	43 ± 7	31 ± 10	24 ± 3
media ± D.T. (n = 3)								

30

[Tabla 3]

Compuesto	Actividad de PDHa (% de actividad de PDHt)							
	Hígado				Tejido adiposo			
	5 h		20 h		5 h		20 h	
	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg	Vehículo	3 mg/kg
Compuesto (2)	28 ± 6	74 ± 12	28 ± 6	50 ± 16	42 ± 4	88 ± 11	42 ± 4	61 ± 15
media ± D.T. (n = 3)								

Ejemplo Experimental 3: Efecto de la administración repetida del compuesto de ensayo sobre HbA1c en ratas ZDF

(Método experimental)

- 5 Las ratas Zucker Obesas Diabéticas (macho, 7 semanas de edad, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN INC.), un modelo animal para diabetes tipo 2, a las que se administra una dieta purificada (dieta con grasa al 5,9 %, Oriental Yeast Co., Ltd.) se asignaron al grupo de vehículo y a los grupos de compuesto de ensayo de modo que no se produjera sesgo en los niveles de glucosa e insulina en plasma, niveles de HbA1c y pesos corporales. Las dosis orales repetidas del compuesto de ensayo (1 mg/kg/5 ml) se administraron las ratas una vez al día a 3 h antes del periodo de oscuridad. Una solución de metilcelulosa acuosa al 0,5 % se administró por vía oral de la misma manera a las ratas del grupo de vehículo. En el día 14 de la administración, las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola y se midió el nivel de HbA1c (%). El análisis estadístico se realizó mediante ensayos de Dunnett. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.
- 10
- 15 Los resultados obtenidos usando el compuesto (2) y el compuesto (3) como compuestos de ensayo se muestran en la Tabla 4 que sigue a continuación.

[Tabla 4]

Compuesto	HbA1c (%)	
	Vehículo	1 mg/kg
Compuesto (2)	3,6 ± 0,3	3,2 ± 0,1*
Compuesto (3)	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,1*

día 14 de administración
media ± D.T. (n = 10)
*p < 0,05 con respecto al grupo de vehículo (ensayo de Dunnett)

- 20 Ejemplo Experimental 4: Ensayo de pinzamiento zonal de células completas de hERG (Gen humano Relacionado con Éter-a-go-go)

(Método experimental)

- 25 Usando células HEK293 transfectadas con el gen humano relacionado con éter-a-go-go (hERG) (Cytomyx Limited), se examinó una influencia en la corriente de hERG de acuerdo con la técnica de pinzamiento zonal de células completas. Las células HEK293 transfectadas con hERG se pasaron usando una incubadora de CO₂ (BNA-111, TABAI ESPEC CORP.) en las condiciones establecidas de 37 °C, CO₂ al 5 %, humedad saturada. Los recipientes de cultivo usados fueron un matraz de 75 cm² Revestido con Colágeno Tipo I (4123-010, AGC TECHNO GLASS CO., Ltd.) y placa de cultivo de 35 mm Revestida con Colágeno Tipo I (4000-010, AGC TECHNO GLASS CO., Ltd.). El medio de cultivo usados fue E-MEM (Medio Esencial Mínimo de Eagle (Sales de Earle, laboratorio biomédico Nikken) añadido con FCS al 10 % (suero de ternera fetal, BioWest, L.L.C.) y Solución de Aminoácidos No Esenciales MEM de al 1 % (NEAA, Invitrogen Corporation). A esto se le añadió geneticina para la selección de células que expresan el gen hERG hasta una concentración de 400 µg/ml. Como las células para la medición, Se sembraron 3 x 10⁴ células HEK293 transfectadas con hERG en una placa de cultivo de 35 mm, de 4 a 7 días antes de la medición de la corriente de hERG. La placa de cultivo producida para la medición contenía el medio de cultivo mencionado anteriormente sin geneticina (Invitrogen Corporation).
- 30
- 35

- 40 La concentración de evaluación más elevada de cada compuesto se determinó a partir de la concentración más elevada a la que no se encontraba precipitación en el fluido extracelular patrón (NaCl: 140 mmol/l, KCl: 2,5 mmol/l, MgCl₂: 2 mmol/l, CaCl₂: 2 mmol/l, HEPES: 10 mmol/l, glucosa: 10 mmol/l (ajustado a pH 7,4 con Tris-base)). Como método de aplicación, cada solución a aplicar se expulsó de un tubo en forma de Y que tenía un diámetro de punta de aproximadamente 0,25 mm, que era adyacente (aproximadamente 2 mm) a las células, y se aplicó a las células. La tasa de expulsión era aproximadamente 0,4 ml/min.
- 45

- El experimento se realizó a temperatura ambiente en un microscopio de contraste de fases. La placa de cultivo de 35 mm sembrada con las células se colocó en un aparato de medición, y el fluido extracelular patrón se aplicó de forma continua a las células desde el tubo en forma de Y. Un electrodo de vidrio para la medición se cargó con un fluido intracelular (Gluconato Potásico: 130 mmol/l, KCl: 20 mmol/l, MgCl₂: 1 mmol/l, ATP-Mg: 5 mmol/l, EGTA: 3,5 mmol/l, HEPES: 10 mmol/l (ajustado a pH 7,2 con Tris-base)). Un método de pinzamiento zonal de células completas convencional se aplicó a las células, y el potencial eléctrico de mantenimiento se ajustó a - 80 mV. Bajo un potencial eléctrico fijo, la corriente de la célula completa se amplificó con un amplificador para pinzamiento zonal (AXOPATCH-200B, Axon Instruments, Inc.), y los datos se cargaron en un ordenador (IMC-P642400, Intermedical Co., Ltd.) usando un software de análisis y adquisición de datos (pCLAMP 9.2, Axon Instruments, Inc.).
- 50

La medición de la corriente de hERG se realizó en las dos etapas que siguen a continuación. En ambos casos, la corriente de hERG se inició proporcionando un potencial de señal de control (potencial eléctrico de mantenimiento - 80 mV, prepulso +20 mV, 1,5 s, pulso de ensayo -50 mV, 1,5 s).

5 Etapa (1): El potencial de señal de control mencionado anteriormente se proporcionó a 0,1 Hz durante 2 min.

Etapa (2): El potencial de señal de control mencionado anteriormente se sometió a resta de P/3 de pCLAMP 9.2 para retirar la corriente de fuga. Esto se repitió tres veces y un promedio del mismo se tomó como corriente de hERG.

10 Después de la etapa (1), se realizó la Etapa (2) (aproximadamente 3 min), y la corriente máxima en la cola obtenida por aplicación de un pulso de ensayo a la corriente de hERG obtenida con el método de la etapa (2) se tomó como un valor de corriente de hERG. En lo sucesivo, las operaciones de (1) y (2) se repitieron de forma alternativa hasta la finalización del experimento y el valor de la corriente de hERG se midió.

15 El valor de la corriente de hERG estable se registró tres veces (aproximadamente 10 min), y el fluido extracelular patrón se intercambiaba de forma instantánea con cada fluido de aplicación. El valor de la corriente de hERG se midió tres veces (aproximadamente 10 min) de la misma manera durante la perfusión del fluido de aplicación, y el valor de la corriente obtenido con la 3ª medición se tomó como un valor de corriente de hERG después de la perfusión del fluido de aplicación.

20 Los datos para cada célula se convirtieron en un valor relativo con un promedio de los tres valores de corriente de hERG registrados aproximadamente 10 min antes de la perfusión del fluido de aplicación (antes del valor) como un 100 %. Esto se midió para dos células, y un promedio de los mismos se calculó como Corriente relativa (%).

$$\text{Corriente relativa (\%)} = 100 \times A \div B$$

25 A: valor de la corriente de hERG después de perfusión del fluido de aplicación
 B: promedio de los tres valores de la corriente de hERG registrados aproximadamente 10 min antes de la perfusión del fluido de aplicación (antes del valor)

30 Además, una tasa de supresión en el grupo de DMSO se calculó de acuerdo con la fórmula que sigue a continuación.

$$\text{Tasa de supresión (\%)} = 100 - (C \div D) \times 100$$

35 C: promedio de corriente relativa (%) de los respectivos grupos de compuesto de ensayo
 D: promedio de corriente relativa (%) del grupo de DMSO

40 Los resultados obtenidos usando el compuesto (2), el compuesto (3), el compuesto (A), el compuesto (B), el compuesto (C) y el compuesto (D) como compuestos de ensayos se muestran en la Tabla 5 que sigue a continuación.

[Tabla 5]

Compuesto de ensayo	Concentración ^{a)} (µmol/l)	Tasa de inhibición (%)	Valor de CI ₅₀ (µmol/l)
Compuesto (2)	30	24,4	> 30
Compuesto (3)	30	27,3	> 30
Compuesto (A)	10	11,8	> 10
Compuesto (B)	1 10	17,4 72,9	3,6
Compuesto (C)	3 30	11,5 69,0	13,2
Compuesto (D)	3 30	9,4 67,5	14,2

a): La concentración de evaluación más elevada de cada compuesto se estableció a partir de la concentración más elevada a la que no se encontró precipitación en el fluido extracelular patrón.

Ejemplo Experimental 5: Ensayo de estabilidad metabólica en microsoma hepático

(Método experimental)

- 5 El microsoma hepático humano (preparado por Xenotech, H0620, concentración final (después de dilución), 0,2 mg de proteína/ml) se suspendió en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,4, que contenía fosfato de dinucleótido de β -nicotinamida y adenina: 1,3 mM, D-glucosa-6-fosfato: 3,3 mM, cloruro de magnesio: 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: 0,45 U/ml), y se mezcló adicionalmente con un compuesto de ensayo disuelto en MeCN/DMSO (95/5) (concentración final 5 μ M). La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min y 60 min, se añadió acetonitrilo que
 10 contenía ácido fórmico (concentración final de un 0,1 %), y la mezcla se centrifugó. El compuesto de ensayo (sin modificar) en el sobrenadante se midió mediante cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas (LC/MS) (fabricado por Waters, LC: Acquity UPLC, Detector de MS:SQ o Detector de TQ). La proporción residual (%) se calculó a partir del valor de medición obtenido.
- 15 Los resultados obtenidos usando el compuesto (2), el compuesto (3), el compuesto (A), el compuesto (B), el compuesto (C) y el compuesto (D) como compuestos de ensayo se muestran en la Tabla 6 que sigue a continuación.

[Tabla 6]

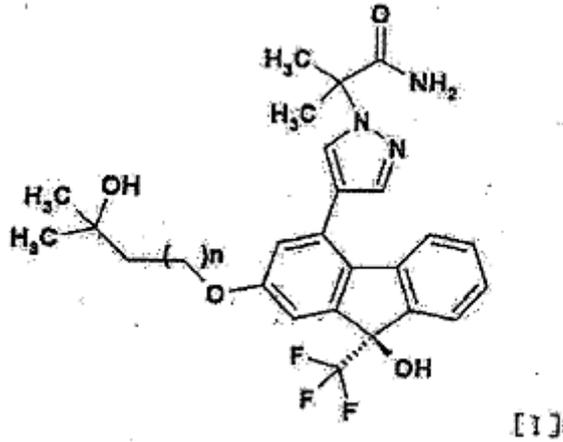
Compuesto de ensayo	Estabilidad en microsoma hepático (% de proporción residual)			
	ser humano		rata	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Compuesto (2)	98,8	96,5	98,8	100,0
Compuesto (3)	98,4	85,9	102,7	95,8
Compuesto (A)	34,8	0,0	24,8	0,0
Compuesto (B)	98,0	88,2	101,1	92,1
Compuesto (C)	94,0	75,1	94,2	85,3
Compuesto (D)	105,4	101,5	105,2	105,1

20 **Aplicabilidad Industrial**

Dado que el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene una actividad inhibitoria de PDHK, éste es útil como un principio activo de un medicamento para la profilaxis o
 25 tratamiento de diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, etc.), síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas (neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, cataratas, etc.), insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica), cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer, hipertensión pulmonar
 30 o enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

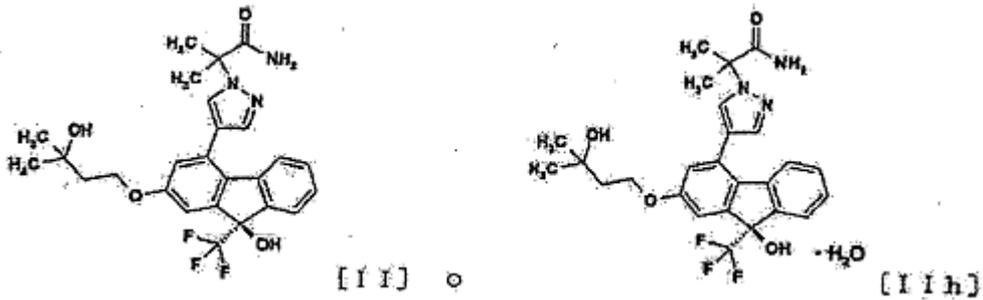
1. Un compuesto representado por la fórmula [I]:



5

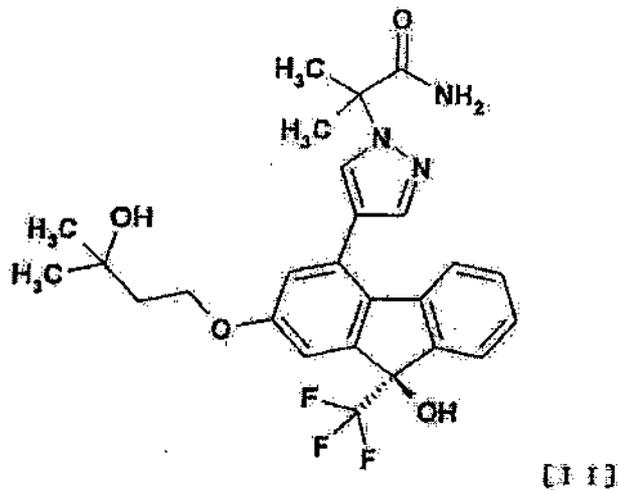
en la que n es 1 o 2,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo.

10 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se representa con las fórmulas:

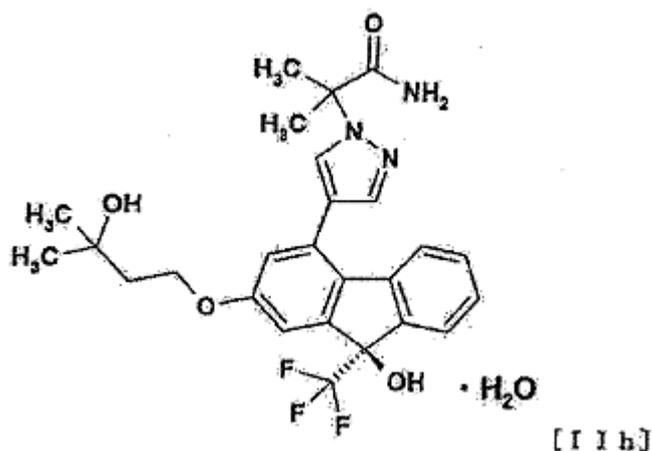


3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que se representa con la fórmula [III]:

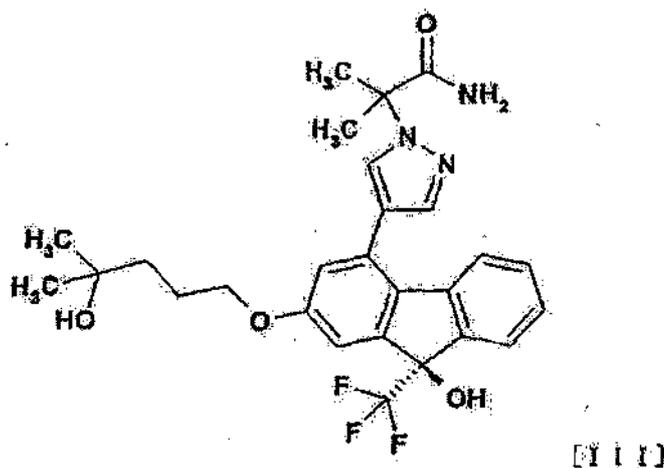
15



4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que se representa con la fórmula [IIh]:



5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se representa con la fórmula [III]:



5

6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

7. Un inhibidor de PDHK que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo.

15

8. Un inhibidor de PDHK1 que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

9. Un inhibidor de PDHK2 que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

20

10. Un agente hipoglucémico que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

11. Un agente para reducir el ácido láctico, que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

25

12. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo para uso en la profilaxis o el tratamiento de diabetes, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer o hipertensión pulmonar.

30

13. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la diabetes es diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.
- 5 14. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las complicaciones diabéticas se seleccionan entre el grupo que consiste en neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética y cataratas.
- 10 15. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca aguda o insuficiencia cardiaca crónica.
- 15 16. Un agente para uso en la profilaxis o el tratamiento de diabetes, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlactacidemia, complicaciones diabéticas, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, isquemia cerebral, ictus hemorrágico, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, cáncer o hipertensión pulmonar, que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.
- 20 17. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la diabetes es diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.
18. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde las complicaciones diabéticas se seleccionan entre el grupo que consiste en neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética y cataratas.
- 25 19. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca aguda o insuficiencia cardiaca crónica.

Fig. 1

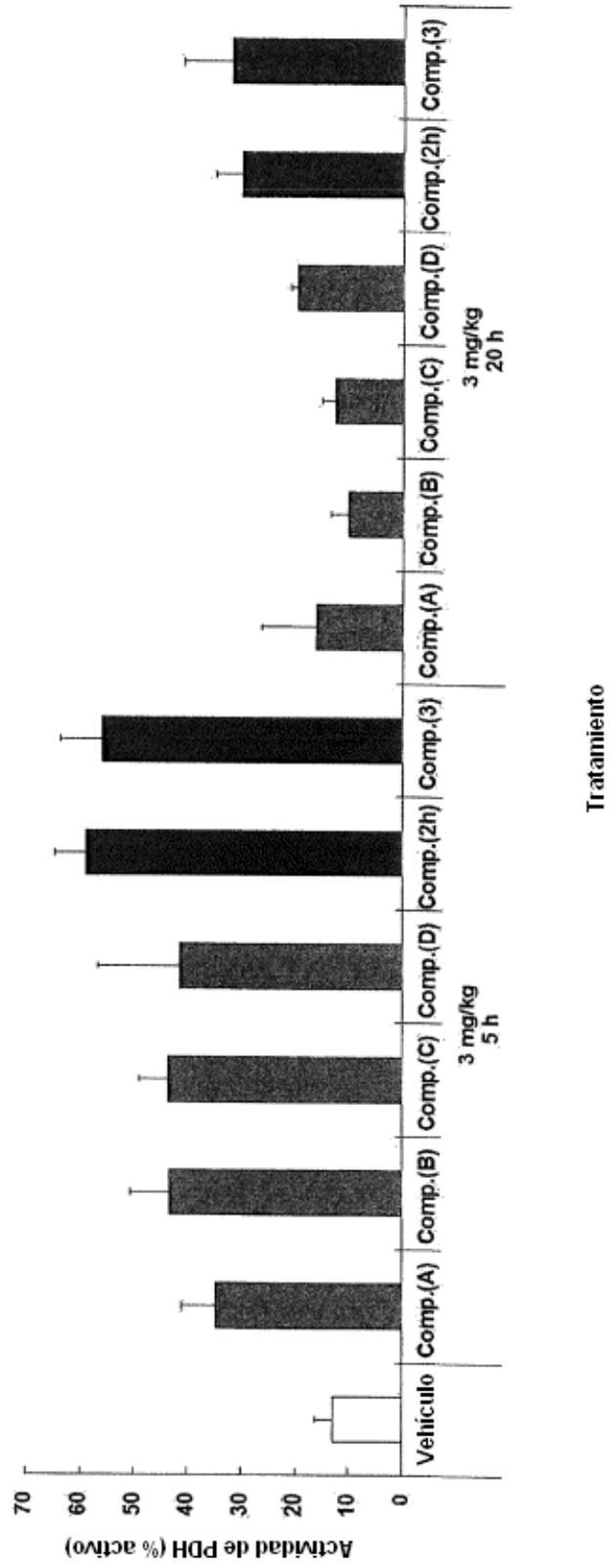


Fig. 2

