

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 302**

51 Int. Cl.:

**C07D 239/42** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2014 PCT/US2014/066339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2014 E 14809734 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3074381**

54 Título: **Novedosos inhibidores de DGAT2**

30 Prioridad:

**25.11.2013 US 201361908339 P**

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

**03.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CAMP, NICHOLAS PAUL y  
NAIK, MANISHA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 695 302 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

Novedosos inhibidores de DGAT2

La presente invención está dirigida a novedosos compuestos útiles para inhibir la diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (DGAT2), que pueden proporcionar terapias útiles para el tratamiento de niveles elevados de triglicéridos y enfermedades cardiovasculares que incluyen dislipidemia y aterosclerosis. La presente invención está dirigida también a un procedimiento de preparación de los compuestos novedosos.

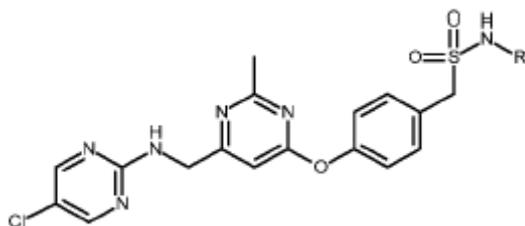
El nivel promedio de triglicéridos en los seres humanos, especialmente en las poblaciones del hemisferio occidental, ha aumentado a un ritmo alarmante en los últimos 30 años. El aumento en los niveles de triglicéridos, o hipercolesterolemia, se ha asociado con una serie de riesgos de enfermedades, incluyendo un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, como dislipidemia y aterosclerosis. El aumento en los niveles de triglicéridos ha coincidido también con un dramático aumento en la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la esteatosis hepática y la enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD). Debido a que los niveles elevados de triglicéridos están implicados en una diversidad de enfermedades y afecciones, el control de la producción y/o del nivel de triglicéridos puede proporcionar un tratamiento viable para la enfermedad metabólica.

La diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (DGAT2) se expresa en muchos tejidos; sin embargo, se expresa principalmente en el hígado y en el tejido adiposo blanco. Está implicada, junto con la DGAT1, en la última etapa para la síntesis de triglicéridos. La inhibición de la actividad de DGAT2 que conduce a una reducción en los niveles de triglicéridos suprimirá el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) mediante el control de la producción a través de la secreción de ApoB o la deposición de esas partículas. Ambos mecanismos están validados farmacológicamente en seres humanos. La limitación de la secreción de partículas de apolipoproteína B (ApoB) reduce la producción de LDL-c. Por lo tanto, la atenuación de la actividad de DGAT2 tiene un impacto favorable sobre los niveles de triglicéridos, LDL-c, ApoB, y la concentración de lipoproteínas ricas en triglicéridos en la circulación y la lipogénesis en el hígado.

El documento WO2013/150416 divulga ciertos derivados de compuestos de purina, pirimidina y pirazina como inhibidores de la DGAT2 y su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la actividad de la DGAT2.

Existe una necesidad de medicamentos adicionales para los tratamientos de hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares, como dislipidemia y aterosclerosis. Los procedimientos de tratamiento actuales, que incluyen dieta, cambios en el estilo de vida y/o terapia con estatinas, pueden no reducir suficientemente los niveles de LDL-c para todos los pacientes con riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además, hay un subconjunto de pacientes que son intolerantes o se vuelven intolerantes a la terapia con estatinas. La presente invención aborda una o más de estas necesidades proporcionando compuestos y procedimientos de tratamiento alternativos, que pueden ser adecuados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

La presente invención proporciona un compuesto según la Fórmula I



en la que R es H o -CH<sub>3</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I en la que R es H o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

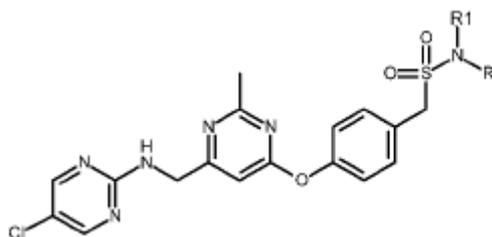
La presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento para enfermedades cardiovasculares. El procedimiento comprende administrar al paciente un compuesto según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el compuesto administrado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto administrado, o sal farmacéuticamente del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.

- 5 En otra forma, la presente descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento para la dislipidemia. El procedimiento comprende administrar al paciente un compuesto de la presente invención según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el compuesto administrado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto administrado o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 10 En todavía otra forma, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento para la aterosclerosis. El procedimiento comprende administrar al paciente un compuesto según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el compuesto administrado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto administrado, o sal farmacéuticamente del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 15 En una forma, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento para la hipertrigliceridemia. El procedimiento comprende administrar al paciente un compuesto según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el compuesto administrado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto administrado, o sal farmacéuticamente del mismo, es un compuesto de Fórmula 1 en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 20 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos uno de un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 Dichas composiciones farmacéuticas y dichos procedimientos de preparación de las composiciones son conocidos en la técnica (consúltese, por ejemplo, Remington; The Science and Practice of Pharmacy, D.B. Troy, Editor, 21<sup>a</sup> Edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).
- 30 La presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento para enfermedad cardiovascular, dislipidemia, aterosclerosis o hipertrigliceridemia. El procedimiento comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la composición farmacéutica administrada comprende un compuesto de fórmula I en la que R es H o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el compuesto administrado o la composición farmacéutica comprende un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 La presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en terapia. En una realización, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 40 En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. De manera alternativa, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 45 En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de la dislipidemia. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. De manera alternativa, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. De manera alternativa, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- 50 En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de la hipertrigliceridemia. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es H. De manera alternativa, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.
- La presente divulgación incluye también el uso de un compuesto según la Fórmula I en la fabricación de un medicamento para tratar una o más de entre: hipertrigliceridemia, enfermedad cardiovascular, dislipidemia y aterosclerosis. En una realización, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto

de Fórmula I en la que R es H. En otra realización, el compuesto o sal farmacéuticamente del mismo es un compuesto de Fórmula I en la que R es -CH<sub>3</sub>.

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de Fórmula 2 a continuación:

5

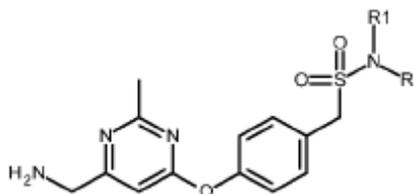


2

10

en la que R es H o -CH<sub>3</sub> y R1 es un grupo protector. El procedimiento comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula 3

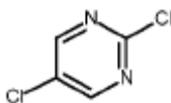
15



3

con un compuesto de Fórmula 4 a continuación:

20



4.

La preparación puede comprender además la etapa de eliminar el grupo protector, R1, de Fórmula 2 para proporcionar el compuesto de Fórmula I.

25

30

35

Los ejemplos de diversas funcionalidades protectoras de amino incluyen: carbamatos tales como carbamato de alquilo C<sub>1-5</sub>, carbamato de cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, preferiblemente un carbamato de t-butilo, (BOC) o carbamato de bencilo (CBZ); amidas como alquilamida C<sub>1-3</sub>, haloalquilamida C<sub>1-3</sub>, formamida o acetamida cloroacetamida, trifluoroacetamida; y bencil aminas. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de funcionalidades protectoras de amino, procedimientos de preparación de los sustituyentes amino protegidos, y procedimientos de desprotección de los sustituyentes amino en "Protecting Groups in Organic Synthesis", 3<sup>a</sup> Ed. Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Eds., John Wiley and Sons, Nueva York, 1999. Las personas expertas en la técnica reconocerán que, además del sustituyente amino protegido, pueden usarse otros grupos funcionales que pueden convertirse fácilmente en el grupo amino. Dichos grupos funcionales, preparaciones y transformaciones de estos grupos pueden encontrarse en "Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations" de Larock, R.C, Wiley VCH, 1999 y en " March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure" Smith, M.B., y March, J., Wiley-Interscience, 6<sup>a</sup> ed. 2007.

40

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a una sal de un compuesto de la invención que se considera aceptable para el uso clínico y/o veterinario. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, N° 1, Enero de 1977.

45

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad efectiva" de un compuesto de Fórmula I se refiere a una cantidad, es decir, una dosis, que es eficaz en el tratamiento de un trastorno, tal como enfermedad cardiovascular, dislipidemia, aterosclerosis o hipertrigliceridemia. El especialista en diagnóstico, como una persona experta en la materia, puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas

convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de una cantidad o dosis efectiva de un compuesto de Fórmula I, se consideran una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a, cuáles de los compuestos de Fórmula I se administrarán; la administración conjunta de otros agentes, si se usa; la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; el grado de implicación o la gravedad del trastorno; la respuesta del paciente individual; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de otros medicamentos concomitantes; y otras circunstancias relevantes.

Como se usan en la presente memoria, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" incluyen restringir, ralentizar, detener, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente.

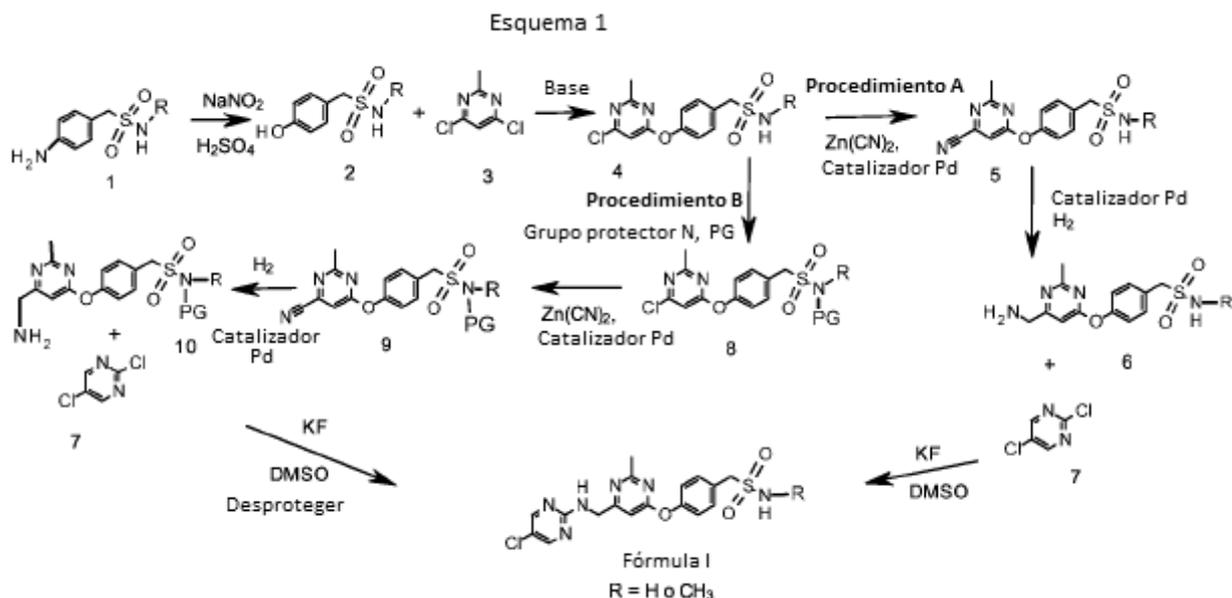
Como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano o mamífero de compañía, tal como un perro o un gato.

### Química General

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados: "DCM" se refiere a diclorometano; "Et<sub>2</sub>O" se refiere a dietiléter; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "h" se refiere a hora; "m" se refiere a minutos; "MeOH" se refiere a metanol; "MS" se refiere a espectroscopía de masas; "RT" se refiere a temperatura ambiente; "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente memoria se nombran y se numeran usando Accelrys Draw 4.0.

El Esquema 1 ilustra una síntesis general de los compuestos de Fórmula I y 2.



En general, la sulfonamida, compuesto 1, puede convertirse en el derivado de fenol, compuesto 2, usando nitrito de sodio y ácido sulfúrico. La reacción del compuesto 2 con 4,6-dicloro-2-metilpirimidina, compuesto 3, proporciona el compuesto de éter 4.

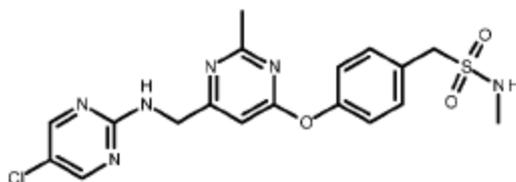
Si siguiendo el Procedimiento A, el cloruro sustituyente del compuesto 4 puede convertirse en el grupo ciano, para el compuesto 5, usando cianuro de zinc y un catalizador de paladio. El grupo ciano en el compuesto 5 puede reducirse al grupo amino en el compuesto 6 usando un catalizador de paladio y gas hidrógeno. La reacción del compuesto de amina 6 con 2,5-dicloropirimidina, compuesto 7, proporciona compuestos de Fórmula I, en la que R puede ser H o un grupo metilo.

De manera alternativa según el Procedimiento B, el nitrógeno de la sulfonamida del compuesto 4 puede protegerse con grupos protectores de nitrógeno conocidos para proporcionar el compuesto 8. El cloruro sustituyente del compuesto 8 puede convertirse en el grupo ciano, en el compuesto 9, usando cianuro de zinc y un catalizador de paladio. El grupo ciano en el compuesto 9 puede reducirse al grupo amino en el compuesto 10 usando un

catalizador de paladio y gas hidrógeno. La reacción del compuesto de amina 10 con 2,5-dicloropirimidina, compuesto 7, y la desprotección simultánea (o posterior) del nitrógeno proporciona compuestos de Fórmula I, en la que R puede ser H o un grupo metilo.

## 5 Ejemplo 1

1-[4-[6-[[[(5-cloropirimidin-2-il)amino]metil]-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida

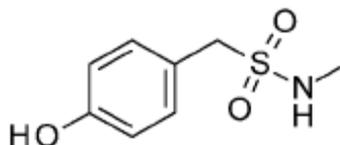


El compuesto del Ejemplo 1 puede mediante el **Procedimiento A** o el **Procedimiento B** como se indica a continuación.

### Procedimiento A

#### Preparación 1

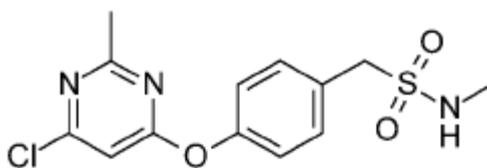
15 1-(4-Hidroxifenil)-N-metil-metanosulfonamida



20 Se añadió ácido sulfúrico (2,5 ml, 44,9 mmol) a una suspensión de 1-(4-aminofenil)-N-metil-metanosulfonamida (7,5 g, 37,5 mmol) en agua (56,2 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 0°C. Lentamente, gota a gota, se añadió una solución de nitrito de sodio (2,8 g; 41,2 mmol) en agua (37,5 ml) a esta suspensión. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 20 m, a continuación, el baño de hielo se retiró y la reacción se calentó a 100°C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con un exceso de agua y se extrajo con EtOAc. Los extractos de EtOAc se combinaron, se lavaron con salmuera; se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>; se filtraron; y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título como un sólido de color naranja (6,2 g, 66%). MS (m/z): 219 (M+H<sub>2</sub>O).

#### Preparación 2

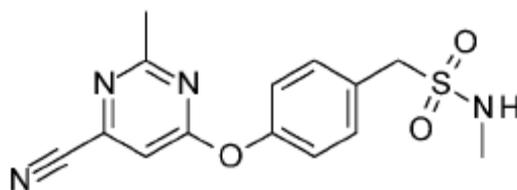
30 1-[4-(6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida



35 Bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió carbonato de potasio (26,4 g, 190,8 mmol) a una solución de 1-(4-hidroxifenil)-N-metil-metanosulfonamida (19,2 g, 95,4 mmol) y 4,6-dicloro-2-metilpirimidina (15,6 g, 95,4 mmol) en DMSO (192,0 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se vertió en 400 ml de hielo/agua (1:1 v/v) para inducir la precipitación. La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos. El sólido se recogió; se lavó con agua; y se secó a presión reducida durante la noche para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón pálido (27,7 g, 89%). MS (m/z): 328 (M+1).

#### 40 Preparación 3

1-[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida



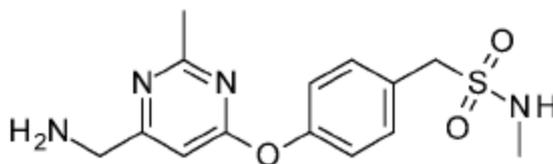
- 5 Se burbujeó gas nitrógeno a través de una solución de 1-[4-(6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (26,6, 81,1 mmol) en DMF (266,0 ml) durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron cianuro de zinc (14,59 g, 121,2 mmol) y cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio (II) (6,76 g, 8,1 mmol). La suspensión se calentó a 150°C durante 6 horas mientras se mantenía bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con agua (600 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Los extractos de EtOAc se combinaron. Los extractos combinados se lavaron secuencialmente con agua (500 ml) y a continuación con salmuera (500 ml); se secaron sobre sulfato de sodio; se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El compuesto del título se aisló usando cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano/EtOAc (1:1) para dar el compuesto del título (18 g, 70%). MS (m/z): 319 (M+1).

### Preparación 3 alternativa

- 15 Se añadió, en porciones, carbonato de potasio (malla 325, 46,5 g, 329,9 mmoles;) a una mezcla de 1-(4-hidroxifenil)-N-metil-metanosulfonamida (40,0 g, 165,0 mmoles) y 6-cloro-2-metil-pirimidina-4-carbonitrilo (26,6 g, 173,2 mmoles;) en acetona (400,0 ml). La mezcla se agitó durante 3 horas a 22°C. La suspensión resultante se filtró y el sólido se enjuagó con acetona. El filtrado y el lavado se combinaron, (el sólido se descartó). El filtrado se concentró para proporcionar un sólido de color marrón. El sólido se suspendió en éter metil tert-butílico (120 ml) y se filtró. El sólido se recogió y se mezcló con éter metil tert-butílico (80 ml) y a continuación se filtró. El sólido se enjuagó con éter metil tert-butílico (80 ml) para dar un sólido de color marrón claro. Se secó en un horno de vacío, 40°C, 50 mbar durante 8 h para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón claro, 52,4 g, 97% de rendimiento. MS (m/z): 319 (M+1).

### Preparación 4

- 25 1-[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida



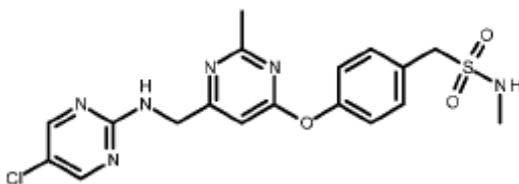
- 30 En un reactor PARR, se combinaron paladio (3,6 g, 10% sobre carbón vegetal, 1-[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (18 g, 56,5 mmol), EtOH (270 ml), EtOAc (270 ml) y trietilamina (31,5 ml). El reactor PARR se selló y se cargó con hidrógeno (400 psi), a continuación, el reactor se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El reactor se abrió y el contenido se filtró a través de CELITE®, la almohadilla CELITE® se lavó con EtOH (1.000 ml), el filtrado se recogió y el disolvente se evaporó para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón (11,1 g, 43%). EM (m/z): 323 (M+1)

### Preparación 4 alternativa

- 40 Se combinó paladio (18,54 g, 10% sobre carbón), 1-[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (46,34 g, 141,19 mmol), 1,4-dioxano (278 ml), EtOH (185 ml) y trietilamina (78,7 ml) en un reactor PARR. El reactor PARR se selló y se cargó con hidrógeno (400 psi). El reactor se agitó a temperatura ambiente durante 4,5 h. El reactor se abrió y los contenidos se filtraron a través de CELITE®. El filtrado se recogió y se evaporó para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo (23,8 g, 48%). MS (m/z): 323 (M+1). La almohadilla de CELITE® se lavó con una mezcla de 1,4-dioxano/MeOH (6 x 500 ml); el filtrado se recogió y el disolvente se evaporó para proporcionar una segunda cosecha del compuesto del título como un sólido de color amarillo (sólido de color rosado, 48%). MS (m/z): 323 (M+1).

### Ejemplo 1

- 1-[4-[6-[[5-cloropirimidin-2-il]amino]metil]-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida



5 Se añadió fluoruro de potasio (1,82 g, 31,33 mmol) a una solución de 1-[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (11,1 g, 24,10 mmol) y 2,5-dicloropirimidina (4,31 g, 28,92 mmol) en DMSO (111 ml). La mezcla de reacción se calentó a 120°C durante dos horas. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente; se añadió agua (200 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos se combinaron; se lavaron secuencialmente con agua (300 ml) y a continuación con salmuera (300 ml); se secaron sobre sulfato de sodio; se filtraron; y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un material bruto. El compuesto del título se purificó usando cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano/EtOAc (1:1) a EtOAc (100%). Se recogieron las fracciones relevantes que contenían el compuesto del título y las fracciones se concentraron. El material resultante se disolvió en THF (200 ml) y EtOAc (300 ml), a continuación, se añadió SiliaMetS® Thiol (9,2 g) para eliminar las trazas de paladio. La mezcla se agitó durante 2 horas a 55°C. La mezcla se filtró a 55°C; el filtrado se recogió; y el disolvente se evaporó para proporcionar un sólido. El sólido se trituró con EtOAc frío (20 ml); se recogió por filtración; y se secó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (8 g, 75%). MS (m/z): 435 (M+1).

#### Preparación alternativa para el Ejemplo 1

20 Se combinaron 1-[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (23,6 g, 67,3 mmol) y 2,5-dicloropirimidina (10,03 g, 67,3 mmol) en DMSO (236 ml). La mezcla se agitó a 22°C durante 1 h. Se añadió fluoruro de potasio (5,14 g, 87,5 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 120°C durante dos horas. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua/hielo (250 ml). Se añadió agua adicional (50 ml) y la mezcla se colocó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. El material sólido resultante se recogió. El sólido se suspendió con agua (100 ml) y el sólido se recogió para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo, 25,7 g, 82% de rendimiento. MS (m/z): 435 (M+1).

25 El compuesto se purificó por cromatografía ultrarrápida (1.500 g de columna SiO<sub>2</sub>; eluyente: hexano/EtOAc 50:50 a 25:75; fracciones de 1 l, carga en DCM/MeOH 30:1, 600 ml). Las fracciones apropiadas se recogieron y se concentraron. El sólido resultante se secó en un horno de vacío, 45°C, 5 mbar durante 18 h para dar el compuesto del título como un sólido de color blanco, MS (m/z): 435 (M+1).

#### Procedimiento B

##### Preparación 5

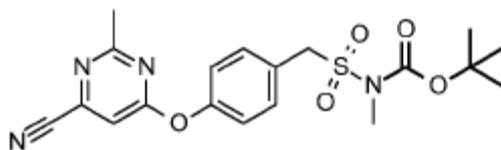
N-[[4-(6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metilsulfonyl]-N-metil-carbamato de tert-butilo



40 Se disolvió 1-[4-(6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida (2,41 g, 4,6 mmol) (véase la Preparación 2) en DCM (10 ml) y se añadió N,N-dimetil-4-piridinamina (56,6 mg, 0,46 mmol). La solución se enfrió a 0°C; se añadió tert-butoxicarbonil tert-butil carbonato (1,5 g, 6,8 mmol); y se agitó durante una hora. La reacción se detuvo con un exceso de 0,5 N HCl. La mezcla se extrajo con DCM. Los extractos de DCM se combinaron; se lavaron con salmuera; se secaron sobre sulfato de magnesio; se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite de color naranja (3,03 g, 99,4%). MS (m/z): 428 (M+1).

##### Preparación 6

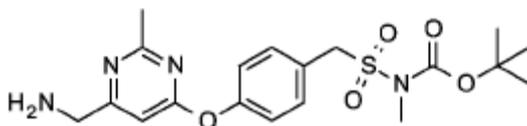
N-[[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metilsulfonyl]-N-metil-carbamato de tert-butilo



5 En una atmósfera de nitrógeno, se combinaron N-[[4-(6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metilsulfonil]-N-metil-carbamato de tert-butilo (2,24 g, 3,4 mmol), DMF (2 ml), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (1,9 g, 1,7 mmol) y cianuro de zinc (2,0 g, 16,8 mmol). La mezcla se calentó a 90°C y se agitó durante 3 horas. La reacción se detuvo con agua e hidróxido de sodio. La mezcla se extrajo con EtOAc; el extracto o los extractos de EtOAc se lavaron con salmuera; se secaron sobre sulfato de magnesio; se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. El compuesto del título se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando 80 g de gel de sílice, y se eluyó con un gradiente del 0-55% de EtOAc en hexanos. Las fracciones relevantes se evaporaron para proporcionar el compuesto del título como un aceite de color amarillo (1,2 g, 80,9%). MS (m/z): 419 (M+1).

### Preparación 7

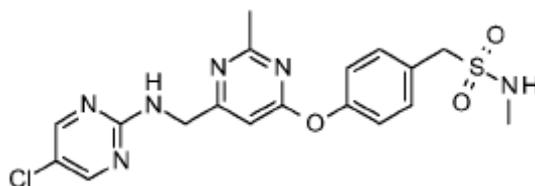
15 N-[[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]metilsulfonil]-N-metil-carbamato de tert-butilo



20 Se combinaron N-[[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metilsulfonil]-N-metil-carbamato de tert-butilo (400 mg, 0,96 mmol), trietilamina (290 mg, 2,9 mmol), MeOH (20 ml) y EtOAc (20 ml) en un reactor PARR. Se añadió el 5% de paladio sobre carbón (203 mg, 0,096 mmol). El reactor PARR se selló y se presurizó con hidrógeno (345 kPa). El reactor se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. El reactor se despresurizó y se abrió. Se añadió una cantidad adicional de paladio al 5% sobre carbón (200 mg, 0,094 mmol); se volvió a presurizar el reactor con hidrógeno (414 kPa) y el reactor se agitó durante 17 horas adicionales mientras se mantenía a temperatura ambiente. El reactor se despresurizó y se abrió. El contenido se filtró a través de tierra de diatomeas y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. Para purificar, se añadió tolueno y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo de color naranja-rojo. La adición y la eliminación de tolueno se repitió 3 veces para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color rosa (0,57 g, 98,8%, 70% de pureza). MS (m/z): 423 (M+1).

### Ejemplo 1

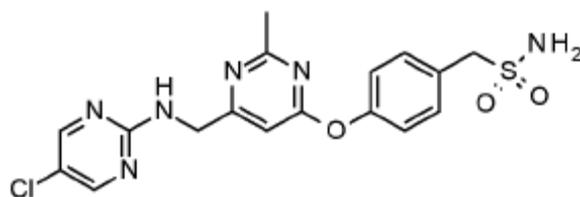
1-[4-[6-[[5-cloropirimidin-2-il]amino]metil]-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]-N-metil-metanosulfonamida



35 Se añadió fluoruro de potasio (53,9 mg, 0,93 mmol) a una solución de N-[[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]metilsulfonil]-N-metil-carbamato de tert-butilo (280 mg, 0,46 mmol) y 2,5-dicloropirimidina (69,1 mg, 0,46 mmol) en DMSO (10 ml). La mezcla se calentó a 120°C y se agitó a esa temperatura durante 17 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc; el extracto o los extractos se combinaron; se secaron con sulfato de magnesio; se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. El compuesto del título se purificó usando cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc en hexanos (0-100%). El compuesto del título se purificó adicionalmente usando una segunda cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-10% de MeOH en DCM. Las fracciones apropiadas se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo vítreo (90 mg, 44,6%). MS (m/z): 435 (M+1).

### Ejemplo 2

1-[4-[6-[[5-cloropirimidina-2-il]amino]metil]-2-metilpirimidina-4-il]oxifenil]metanosulfonamida

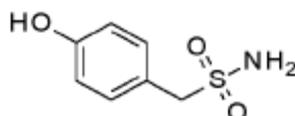


5

El compuesto del Ejemplo 2 puede prepararse mediante el procedimiento indicado a continuación.

### Preparación 8

(4-hidroxifenil)metanosulfonamida

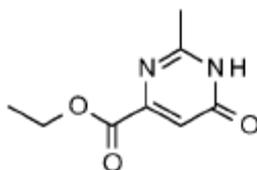


10

La preparación 8 se prepara esencialmente mediante la Preparación 1, Procedimiento A. MS (m/z): 205 (M+H<sub>2</sub>O).

### Preparación 9

2-metil-6-oxo-1H-pirimidin-4-carboxilato de etilo



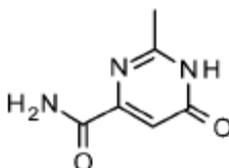
15

20 Se añadió sal de clorhidrato de acetamida (13,9 g, 147 mmol) a una solución de but-2-inedioato de dietilo (25 g, 147 mmol) en acetonitrilo (100 ml); a continuación, lentamente, gota a gota, se añadió trietilamina (22,5 ml, 162 mmol) a la mezcla. La mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 12 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con MeOH (50 ml). El compuesto del título se purificó usando cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM (0-10%). Las fracciones apropiadas se combinaron y los disolventes se eliminaron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón (7,4 g, 27,5%). MS (m/z): 183 (M+1).

25

### Preparación 10

2-metil-6-oxo-1H-pirimidin-4-carboxamida

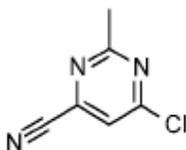


30

35 Se disolvió 2-metil-6-oxo-1H-pirimidin-4-carboxilato de etilo (7,26 g, 39,9 mmol) en una solución de amoníaco en MeOH (70 ml, 7 N) y la mezcla se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color negro (5,7 g, 93,4%). MS (m/z): 154 (M+1).

### Preparación 11

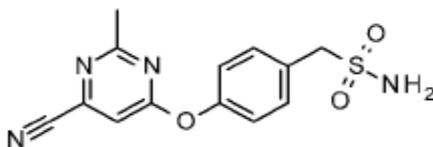
6-cloro-2-metil-pirimidin-4-carbonitrilo



Se combinó 2-metil-6-oxo-1H-pirimidina-4-carboxamida (46 g, 140 mmol) con cloruro de fosforilo (32,5 ml, 349 mmol); la mezcla se calentó a 100°C y se agitó durante 17 horas. El exceso de cloruro de fosforilo se eliminó a presión reducida para proporcionar una suspensión espesa negra. La suspensión se añadió lentamente a agua (700 ml) y la mezcla se filtró a través de CELITE®. El filtrado se extrajo con Et<sub>2</sub>O. Los extractos se combinaron; se secaron sobre sulfato de magnesio; los disolventes volátiles se eliminaron del filtrado bajo presión reducida para proporcionar un sólido de color negro. El compuesto del título se purificó usando cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH/DCM (0-10%). Las fracciones apropiadas se combinaron y los disolventes se eliminaron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo (2,5 g, 12%). MS (m/z): 154 (M+1).

### Preparación 12

[4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metanosulfonamida



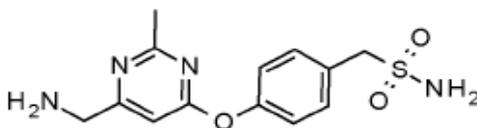
Se disolvió 6-cloro-2-metilpirimidina-4-carbonitrilo (628 mg, 4,1 mmol) en DMF (15 ml) a TA bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron (4-hidroxifenil)metanosulfonamida (859 mg, 4,1 mmol) y carbonato de potasio (1,13 g, 8,2 mmol) a la solución. Se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se vertió en una solución de salmuera y se extrajo con EtOAc. Los extractos se combinaron; se secaron sobre sulfato de magnesio; se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (80% de pureza, 1,5 g, 96,4%). MS (m/z): 305 (M+1).

### Preparación alternativa 12

Se combinaron (4-hidroxifenil)metanosulfonamida (55 g, 269,1 mmol) y 6-cloro-2-metilpirimidina-4-carbonitrilo (45,5 g, 296 mmol) en acetonitrilo (605 ml) a 22°C. La mezcla se colocó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos y se agitó a 22°C durante 10 minutos. Se añadió carbonato de potasio (malla 325) (75,9 g, 538,2 mmol) a la solución y se agitó a 22°C durante 4 horas. La mezcla se filtró y el sólido se enjuagó con acetonitrilo (3 x 150 ml). Los filtrados se concentraron para dar un sólido de color marrón. El sólido se suspendió en éter metil tert-butílico (200 ml) y el sólido se recogió. El sólido se enjuagó con éter metil tert-butílico y agua (2 x 200 ml). El sólido se recogió y el sólido húmedo se secó en un horno de vacío, 15 mbar, 45°C para proporcionar el compuesto del título como un sólido, 67,21 g, 79% de rendimiento, EM (m/z): 305 (M+1).

### Preparación 13

[4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil] metanosulfonamida

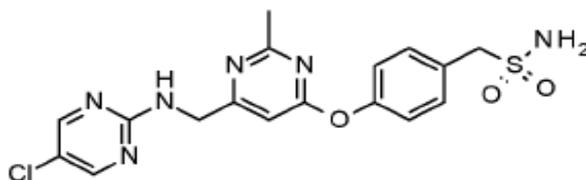


La preparación 13 se prepara esencialmente mediante el procedimiento de la Preparación 7 (o 4). MS (m/z): 309 (M+1).

Se combinaron trietilamina (117,83 ml) y paladio al 10% en carbón (20,10 g) a una solución de [4-(6-ciano-2-metil-pirimidin-4-il)oxifenil]metanosulfonamida (67 g, 211,35 mmoles) en una mezcla de 1,4-dioxano (469 ml) y EtOH (201 ml; 159,05 g) en un reactor PARR. La mezcla se mantuvo a 22°C. El reactor se selló y se presurizó con hidrógeno (400 PSI). El reactor se agitó durante 18 h mientras se mantenía a 22°C. A continuación, el reactor se abrió y los sólidos se filtraron. El residuo sólido se enjuagó con MeOH (1 l), una mezcla de dioxano/MeOH 1:1 (1 l) y MeOH (3 x 1 l). El filtrado se recogió y se concentró para proporcionar un sólido. El sólido se recogió y se secó en un horno de vacío (45°C, 15 mbar) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo, 62,41 g, 77% de rendimiento. MS (m/z): 309 (M+1).

### Ejemplo 2

1-{4-[[6-[(5-cloropirimidina-2-il)amino]metil]-2-metilpirimidina-4-il]oxi]fenil}metanosulfonamida



- 5 El Ejemplo 2 se prepara esencialmente mediante la etapa final en el Procedimiento A para el Ejemplo 1 anterior. MS (m/z): 421 (M+1).

#### Preparación alternativa para el Ejemplo 2.

10 Se añadió 2,5-dicloropirimidina (24,76 g, 162,9 mmoles) a una solución de [4-[6-(aminometil)-2-metil-pirimidin-4-il]oxifenil]metanosulfonamida (62 g, 162,9 mmoles; 62,00 g) en dimetilsulfóxido (620 ml) a 22°C. La mezcla se agitó durante 5 min y se añadió fluoruro de potasio (10,51 g, 179,1 mmoles). La mezcla se calentó a 120°C durante 2 h; a continuación, se enfrió a 22°C. La mezcla se vertió en agua helada (1,2 l) y la suspensión se filtró. El sólido se recogió y se mezcló en agua (100 ml) y a continuación el sólido se recogió. Este sólido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (columna de 1500 g; eluyente: DCM/MeOH 100:0 a 95:5; fracciones de 1 l, se cargó en DCM/MeOH 80:20 (500 ml). Las fracciones apropiadas se recogieron y se concentraron para proporcionar un sólido. El sólido se suspendió en alcohol isopropílico (250 ml), la suspensión resultante se colocó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. El sólido se recogió y se enjuagó con alcohol isopropílico para obtener un sólido de color amarillo pálido. El sólido se suspendió de nuevo en alcohol isopropílico (600 ml) y la suspensión se colocó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. La suspensión de alcohol se concentró mediante un rotavapor a 80°C. El sólido se recogió y se secó en vacío (0,5 mbar, 22°C) durante 1 h. El sólido se añadió a EtOH (600 ml) y la mezcla se colocó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. La mezcla se concentró mediante un rotavapor a 60°C. El sólido de color amarillo se recogió y se secó en vacío 0,5 mbar, 22°C durante 1 h.

25 El sólido se suspendió en EtOH (680,2 ml). La suspensión resultante se calentó a 95°C y se añadió dimetilsulfóxido (331,1 ml) para proporcionar una solución de color amarillo claro. El agua se eliminó con EtOH (680 ml) destilando el disolvente usando un aparato dean-stark/condensador de reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno. Puede añadirse EtOH adicional (680 ml) al azeótropo del agua restante. A continuación, se añadió agua (421,8 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 95°C. La mezcla se enfrió a 22°C y se agitó durante 18 h. La suspensión se filtró. El sólido se recogió y se enjuagó con agua (2 x 100 ml). El sólido se secó en vacío (10 mbar, 40°C, 18 h) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo, 41,3 g, rendimiento del 61%, MS (m/z): 421 (M+1).

#### Biología general

35 La enfermedad vascular aterosclerótica sigue siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en las sociedades industriales. Uno de los factores de riesgo bien conocidos para esa enfermedad es una alta concentración de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) en la circulación. A pesar de la disponibilidad de múltiples clases de agentes terapéuticos que reducen el colesterol LDL, incluyendo la principal clase terapéutica, las estatinas, la incidencia de los eventos cardiovasculares importantes sigue siendo alta en los pacientes con enfermedad coronaria (CHD). Además, hay un subconjunto de pacientes que son intolerantes a la terapia más efectiva, las estatinas (Gotto, A.M., y Moon, J.E., Nature Rev. Cardiol., (2013) 10:560-570) Los compuestos de esa clase reducen el colesterol LDL, principalmente mediante la regulación al alza del receptor de LDL y la posterior recaptación de LDL en el hígado. Un procedimiento alternativo, y potencialmente igualmente eficaz, sería la disminución de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que eventualmente se convierten en LDL en la circulación. Se ha demostrado que dos nuevas clases de agentes terapéuticos, inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsómicos (MTP), lomitapida, e inhibidor de la síntesis de ApoB, mipomersen, que reducen ambos la secreción de VLDL, reducen el colesterol LDL. Sin embargo, cada uno de esos agentes está asociado con eventos adversos, lo que limita su utilidad. En particular, la terapia con lomitapida se asocia con un aumento de 8 veces en el contenido de grasa hepática. Por el contrario, la inhibición de DGAT2 reducirá la producción de triglicéridos en el hígado, lo que a su vez conducirá a la reducción de la secreción de VLDL y a la posterior disminución del colesterol LDL. Además, la declaración científica de la American Heart Association respalda el establecimiento de los triglicéridos elevados como diana terapéutica como medio para reducir el riesgo cardiovascular residual (Miller, M. et al, Circulation (2011) 123:2292-2333. La inhibición de DGAT2 disminuirá los triglicéridos circulantes y, de esta manera, proporcionará protección adicional contra los eventos cardiovasculares.

#### Ensayo bioquímico de diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2)

La actividad inhibitora *in vitro* de los compuestos contra la DGAT2 humana se evaluó en este ensayo. El ensayo usó DGAT2 humana recombinante con un marcador FLAG en el extremo amino, expresada en células SF9 de insecto modificadas genéticamente, y purificada mediante cromatografía de afinidad.

5 La DGAT2 cataliza la transferencia de un resto acilo desde la acil-Coenzima A al diacilglicerol, para formar triacilglicerol. En esta realización particular del ensayo, el oleato se usó como el resto acilo transferido. Para facilitar la miscibilidad de todos los componentes lipídicos, todos los lípidos usados en el ensayo contenían un resto oleilo como el único grupo acilo.

10 Antes del inicio del ensayo, se preparó una mezcla de dioleoil glicerol (DOG) y dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) a una relación molar de 3:7. Se mezcló la cantidad apropiada de DOPC y DOG disuelto en cloroformo en un tubo de ensayo de vidrio de borosilicato. El disolvente se evaporó bajo una corriente de argón para formar una película de lípidos. Posteriormente, el tubo de ensayo se colocó bajo vacío (<1 Torr) durante 2 horas para eliminar el disolvente residual. Se añadió la cantidad apropiada de tampón que contenía TrisHCl (pH 7,5, 150 mM) y sacarosa (250 mM) para conseguir una concentración 20 mM de lípido total. Se garantizó la suspensión completa de la película de lípidos mediante agitación vigorosa. El contenido del tubo se sonicó en un sonicador con baño de agua bajo condiciones de onda estacionaria hasta que la suspensión pasó de turbia a translúcida, para garantizar la conversión de los liposomas en vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

El compuesto de ensayo se preparó disolviéndolo y diluyéndolo en serie en incrementos semi-logarítmicos en DMSO. Para cada concentración, se realizó una etapa de dilución de 10 veces de la solución del compuesto en DMSO en un tampón que contenía TrisHCl (pH 7,5, 150 mM) y sacarosa (250 mM).

20 Las suspensiones de SUV y la solución de compuesto se mezclaron con otros componentes del ensayo para lograr la siguiente concentración de ingredientes individuales: TrisHCl (pH 7,5, 150 mM), sacarosa (250 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), ditioneitol (DTT) (0,5 mM), oleoil coenzima A (oleoil-CoA) (12 μM), 1-<sup>14</sup>C oleoil coenzima A (oleoil-CoA-<sup>14</sup>C) (8 μM), dioleoil glicerol (DOG) (0,6 mM) y dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) (1,4 mM), proteína DGAT2 (0,5 nM), DMSO (1%, v/v), con una concentración del compuesto de ensayo comprendida de un intervalo de 1 nM a 100 μM, en 30 μl de volumen total. La reacción se incubó durante 1 hora a TA (aproximadamente 21°C) en pocillos individuales de una placa de 384 pocillos. Después de 1 hora, la reacción se detuvo añadiendo 23 μl de solución de parada que contenía una mezcla de isopropanol:EtOH:heptano:agua DI:NaOH 1 N (59:12,5:15:11:2,5, en volumen). Se añadieron 42 μl de Microscint E y a continuación la mezcla se incubó durante la noche para extraer el triglicérido en la capa de disolvente orgánico que contenía centellante. La radioactividad se midió usando un instrumento Perkin-Elmer TopCount. Se estableció una medición de base para la reacción repitiendo el procedimiento anterior, pero sin incluir la enzima o el compuesto de ensayo en la mezcla de reacción. El grado de inhibición de DGAT2 se calculó midiendo la radioactividad a 10 concentraciones diferentes para cada compuesto. El IC<sub>50</sub> se determinó para cada compuesto usando un ajuste de curva logística de 4 parámetros. La media geométrica para los valores IC<sub>50</sub> calculados para los Ejemplos 1 y 2 se enumeran en la Tabla 1. Los datos enumerados en la Tabla 1 demuestran que ambos Ejemplos 1 y 2 inhiben la DGAT2 humana en un ensayo de tampón *in vitro*.

Tabla 1

Ejemplo	IC <sub>50</sub> (μM) n = número de experimentos
1	0,091 (n = 19, dt = 0,066)
2	0,12 (n = 13, dt = 0,076)
<b>n = número de experimentos</b>	
<b>dt = desviación típica</b>	

Ensayo de diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2) basado en células

40 En este ensayo se valió la actividad inhibitora de los compuestos contra la DGAT2 humana en un entorno celular. Este ensayo usó una línea celular de hepatoma humano, HepG2, como fuente de actividad aciltransferasa.

La línea celular HepG2 es un modelo usado comúnmente para reacciones metabólicas que ocurren en los hepatocitos humanos *in vivo*. La síntesis de triglicéridos en esta línea celular fue seguida por una medición de la incorporación de oleato marcado isotópicamente a la trioleína (un triglicérido con 3 restos oleílicos).

45 Las células HepG2 se dispensaron en una microplaca de 96 pocillos, que se había recubierto previamente con Poly-D-lisina, en una cantidad de 50.000 células/pocillo en 100 μl de Medio Mínimo Esencial (MEM) con 10% de

Suero Fetal Bovino (FBS). Las células se incubaron durante 16 horas a 37°C. El medio de cultivo celular se reemplazó con MEM que contenía 2% de albúmina de suero bovino. El compuesto de ensayo se disolvió en DMSO al 0,5% y se prepararon diluciones en serie en incrementos semi-logarítmicos. El compuesto de ensayo diluido en serie se añadió a pocillos separados. Se incubó durante 0,5 horas a 37°C. A continuación, el medio de cultivo celular se reemplazó por un medio de la misma composición, pero que incluía 50 µM <sup>13</sup>CO<sub>18</sub>-oleato y 300 µM de hidropropil-β-ciclodextrina. Se incubó durante 4 horas adicionales a 37°C. El medio de cultivo celular se descartó volteando la microplaca, drenando de esta manera los pocillos y a continuación absorbiendo cualquier medio residual de los pocillos con una toalla de papel. La microplaca se secó a temperatura ambiente (~21°C) durante 10 min. Se añadieron alícuotas de 125 µl de disolvente (alcohol isopropílico:tetrahidrofurano:metanol:cloroformo, en una proporción de 90:10:2,5:2,5 v/v), un estándar interno para fosfatidilcolina (PC) y un estándar interno para triacilglicerol (TG) a cada pocillo. La placa se selló y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron alícuotas de 100 µl de la fase superior de cada pocillo a unos pocillos de una placa de pocillos profundos (2 ml por pocillo). El contenido de los pozos se analizó usando un análisis de espectrometría de masas. Ambos trioleinas se midieron con un solo resto <sup>13</sup>CO<sub>18</sub>-oleato y POPC usando un procedimiento de cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS). El grado de incorporación de un único resto <sup>13</sup>CO<sub>18</sub>-oleato en trioleína, normalizado a la concentración de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) se usó como una medida de la actividad de DGAT2.

Se determinó el valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto, usando un ajuste de curva logística de 4 parámetros. La media geométrica para los valores IC<sub>50</sub> calculados para los Ejemplos 1 y 2 se enumeran en la Tabla 2 a continuación. Los datos enumerados en la Tabla 2 demuestran que ambos Ejemplos 1 y 2 inhiben la DGAT2 humana en un ensayo basado en células.

Tabla 2

Ejemplo	IC <sub>50</sub> (µM)
1	0,15 (n = 2)
2	0,15 (n = 3)
<b>n = número de experimentos</b>	

#### Ensayo farmacodinámico in vivo

Este ensayo midió la potencia de los compuestos mediante la medición de la reducción de triglicéridos en plasma en ratones tratados con los compuestos de ensayo en comparación con los animales de control tratados solo con la solución de vehículo. En este ensayo, se usaron ratones C57BL6 macho (de 10 a 11 semanas de edad, cada uno de aproximadamente 22 g de peso).

Los triglicéridos sintetizados en el hígado se secretan a la circulación como un componente de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Para prevenir la degradación de los triglicéridos en circulación por la Lipoproteína Lipasa (LPL), este ensayo usa una inyección IV de un detergente, tiloxapol, que inhibe la actividad de la LPL. Debido a que otra enzima, DGAT1, participa en la síntesis de los triglicéridos hepáticos, en este ensayo se usa también una dosis saturante de un inhibidor de DGAT1 (*trans*-4-[4-(4-amino-7,7-dimetil-7H-pirimidol[4,5-b][1,4]oxazin-6-il)fenil]ciclohexil]acetato de sodio, convención de nomenclatura IUPAC ACDLABS, véase Dow et al. *Bioorg. Y Med. Chem.*, (2011) 21(20), 6122-6128).

Se preparó una suspensión del compuesto de ensayo (inhibidor de DGAT2) mezclado con el inhibidor de DGAT1 en un vehículo adecuado, para asegurar la dosificación de 10 ml/kg de suspensión de compuesto y 3 mg/kg de dosis del inhibidor de DGAT1. En este conjunto de experimentos, el vehículo es 1% de hidroxietilcelulosa, 0,25% de polisorbato 80 y 0,05% de antiespumante en agua purificada. Los ratones fueron sometidos a ayuno durante 4 horas antes del tratamiento. La suspensión del compuesto de ensayo (inhibidor de DGAT2) se administró a los ratones de ensayo, mediante sonda, a 5 dosis comprendidas entre 0,1 y 10 mg/kg, junto con la dosis de 3 mg/kg del inhibidor de DGAT1. De manera similar, se administró solo vehículo (10 ml/g) a un conjunto de ratones de control. Treinta minutos después, se administró a cada ratón, mediante inyección retroorbital, una dosis de 400 mg/kg de tiloxapol. Después de 30 minutos adicionales, los ratones se sacrificaron con CO<sub>2</sub>.

La sangre se recogió a través de una punción cardíaca en un tubo que contenía el anticoagulante EDTA. El plasma se recogió después de la centrifugación de la sangre a 3.000 g durante 10 minutos. Las muestras de plasma se congelaron en hielo seco hasta su análisis. Las muestras se descongelaron con hielo húmedo. La concentración de triglicéridos en el plasma se determinó usando un analizador químico clínico automatizado. La reducción en los triglicéridos totales en los ratones de ensayo se calculó con relación a la concentración de triglicéridos en los

ratones de control. Los resultados para los Ejemplos 1 y 2 se enumeran a continuación en la Tabla 3. Los datos en la Tabla 3 demuestran que los Ejemplos 1 y 2 reducen la concentración de triglicéridos en plasma.

**Tabla 3**

<b>Ejemplo</b>	<b>ED<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
1	0,29
2	0,27

Modelo de eficacia in vivo

5 Este ensayo midió la potencia de los compuestos mediante la medición de la reducción del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c) y triglicéridos (TG). En este ensayo, se usaron ratones machos, deficientes en receptores de LDL (29 semanas de edad, cada uno de aproximadamente 30 g de peso).

10 Los ratones deficientes en receptores de LDL se seleccionaron para ese ensayo para demostrar que cualquier reducción medida de colesterol LDL se consiguió independientemente de la captación de LDL mediada por el receptor de LDL en el hígado.

15 Los ratones se alimentaron con una dieta estándar de comida para ratones durante dos semanas antes de la administración. Se preparó una solución de ensayo para la alimentación por sonda oral suspendiendo los compuestos en acacia a 0,3, 1 y 3 mg/ml. Los ratones se separaron en un grupo de ensayo y un grupo de control. Posteriormente, en el primer día de la tercera semana, los ratones en el grupo de ensayo recibieron dosis con la solución de ensayo durante catorce días, BID. De manera similar, los ratones en el grupo de control recibieron dosis con solo el vehículo sin ninguno de los compuestos de ensayo. Cuatro horas después de la última dosis, los ratones se sacrificaron con CO<sub>2</sub>. La sangre se recogió inmediatamente mediante punción cardíaca. El suero se aisló para medir los triglicéridos en suero, así como el colesterol en fracciones de lipoproteínas individuales. Las fracciones de lipoproteínas se separaron mediante procedimientos de HPLC conocidos. La concentración de colesterol asociada con cada fracción de lipoproteína se determinó mediante un procedimiento colorimétrico (Roche Cholesterol/HP Reagent 11875540), usando fracciones de lipoproteínas aisladas con concentraciones de colesterol conocidas como estándares. Los resultados obtenidos a la dosis más alta, 30 mg/kg, BID, se expresaron como el porcentaje de cambio en comparación con las concentraciones de LDL-c, VLDL-c y TG en suero en el grupo de ensayo con relación a las de los ratones en el grupo de control. Los resultados para el Ejemplo 1 se enumeran en la Tabla 4. Los resultados demuestran que el Ejemplo 1 reduce las concentraciones de LDL-c, VLDL-c y TG en suero.

**Tabla 4**

<b>Parámetro</b>	<b>% de cambio</b>
LDL-c	-51%
VLDL-c	-75%
Triglicéridos	-63%

30 Los resultados enumerados en la Tabla 5 demuestran que el Ejemplo 2 reduce también las concentraciones de LDL-c, VLDL-c y TG en suero. Para permitir la absorción del Ejemplo 2 a la dosis de 30 mg/kg, ese compuesto se preparó como una mezcla seca 1:1 (p/p) con hidroxipropil metilcelulosa antes de la adición al vehículo de acacia.

**Tabla 5**

<b>Parámetro</b>	<b>% de cambio</b>
LDL-c	-55%
VLDL-c	-82%
Triglicéridos	-72%

5 Un médico u otro personal médico podrá determinar una cantidad efectiva del compuesto para el tratamiento de una persona que lo necesita. Las composiciones farmacéuticas preferentes pueden formularse como un comprimido o una cápsula para la administración oral. El comprimido o la cápsula puede incluir un compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para el tratamiento de un paciente que necesite tratamiento para enfermedad cardiovascular, dislipidemia, aterosclerosis o hipertrigliceridemia.

Los compuestos ejemplificados de la presente invención pueden usarse solos o combinados con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

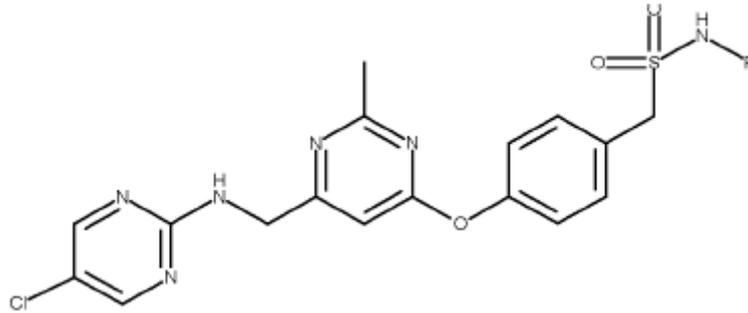
10 Los compuestos ejemplificados pueden combinarse con agentes terapéuticos adicionales usados para tratar enfermedades cardiovasculares, tales como: niacina, aspirina, estatinas, inhibidores de CETP y fibratos. Los ejemplos de estatinas incluyen atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina. Los ejemplos de fibratos incluyen bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo y fenofibrato.

15 Los compuestos ejemplificados y el agente o los agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse juntos a través de la misma ruta y dispositivo de administración, tal como una única píldora, cápsula o comprimido; o pueden administrarse por separado bien al mismo tiempo en dispositivos de administración separados o bien secuencialmente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula:

5



10 en la que R es H o -CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

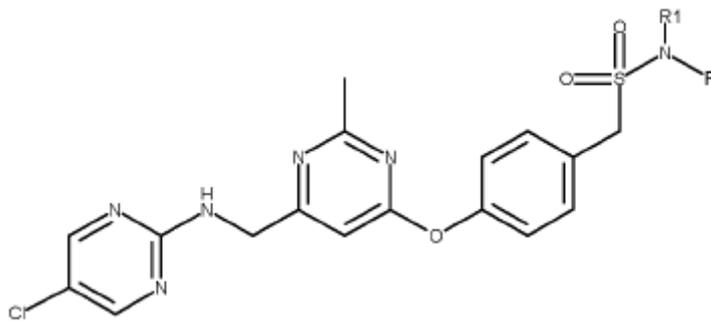
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R es H, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R es -CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos uno de entre un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. Un procedimiento de preparación de un compuesto de Fórmula:

20



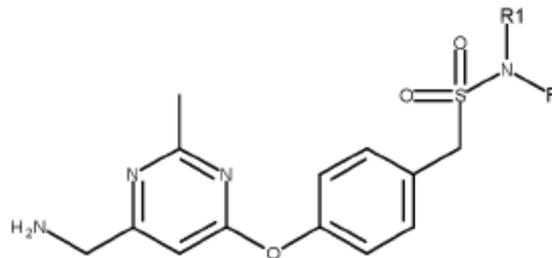
2

25 en la que R es H o -CH<sub>3</sub> y

R1 es H o un grupo protector de nitrógeno, comprendiendo dicho procedimiento:

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula 3

30

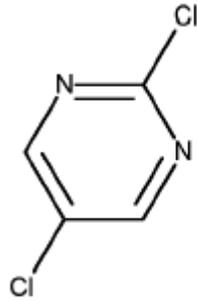


3

con un compuesto de Fórmula 4 a continuación:

35

5



4.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia.

10 7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 6, en el que dicha terapia es el tratamiento de enfermedad cardiovascular, dislipidemia, aterosclerosis o hipertrigliceridemia.