

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 763**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2016 PCT/US2016/027177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2016 E 16717800 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3283473**

54 Título: **Inhibidores de grelina O-acil transferasa**

30 Prioridad:

15.04.2015 EP 15382180

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

06.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GALKA, CHRISTOPHER STANLEY;
HEMBRE, ERIK JAMES;
HONIGSCHMIDT, NICHOLAS ALLAN;
MARTINEZ-GRAU, MARIA ANGELES;
PLAZA, GEMA RUANO y
RUBIO, ALMUDENA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 715 763 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).

DESCRIPCION

Inhibidores de grelina O-acil transferasa

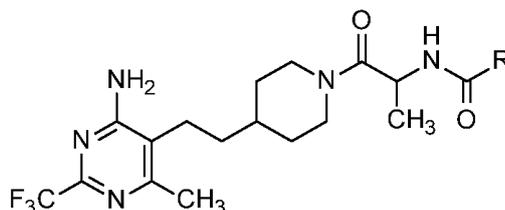
La presente invención se refiere a compuestos útiles para la inhibición de la grelina O-acil transferasa (GOAT), composiciones farmacéuticas y compuestos para uso en procedimientos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de la GOAT.

La GOAT pertenece a la familia de enzimas O-acil transferasa unida a la membrana (MBOAT). Convierte a la desacilgrelina (también conocida como grelina no acilada o UAG) en una forma biológicamente activa, la acil-grelina (AG), mediante la transferencia de un ácido graso al resto Ser3 del péptido desacilgrelina. La acil-grelina se ha indicado que incrementa la ingesta de alimento e incrementa la adiposidad en humanos y roedores. La infusión de AG en humanos se ha indicado igualmente que suprime la secreción de insulina inducida por glucosa. La eliminación del gen de la grelina se ha indicado que potencia la liberación de insulina para prevenir o mejorar la intolerancia a la glucosa en ratones ob/ob alimentados con dieta alta en grasa.

Se ha informado en la literatura de inhibidores de la GOAT de molécula pequeña. Véase la WO 2013/125732.

Sin embargo, la prevalencia de la obesidad y la diabetes asociada con la efectividad y respuestas variables a los tratamientos usuales para la obesidad y la diabetes necesita que estén disponibles para los pacientes más opciones de tratamientos. La presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que son inhibidores de la GOAT. Dichos nuevos compuestos podrían enfrentarse a la necesidad de un tratamiento efectivo, potente, de la obesidad. Se considera además que un inhibidor de la GOAT puede ser igualmente útil en la reducción de la ganancia de peso o la recuperación de peso como un auxiliar a la dieta y/o al ejercicio, a otros agentes medicinales terapéuticos o de procedimientos diseñados para la reducción de la ganancia de peso o para tratar la obesidad. De manera similar, un inhibidor de la GOAT puede ser útil en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, de manera individual o en combinación con otros tratamientos para la diabetes de tipo 2.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula



en la que R está seleccionado entre alquilo de $-C_1-C_3$ opcionalmente sustituido con $-OH$; alquilo de $-OC_1-C_4$; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con $-CH_3$; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con $-Cl$; y fenilo opcionalmente sustituido con $-OCH_3$; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

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

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

La presente invención proporciona igualmente un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia, en particular para la reducción de la ganancia de peso o de recuperación del peso o de tratamiento de la diabetes de tipo 2 o de la obesidad. Incluso además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en la reducción de la ganancia de peso o de recuperación del peso o de tratamiento de la diabetes de tipo 2 o de la obesidad. Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para la reducción de la ganancia de peso o de recuperación del peso o de tratamiento de la diabetes de tipo 2 o de la obesidad,

La presente invención proporciona además compuestos para uso en un procedimiento de tratamiento de secuelas de un episodio isquémico, que comprende la administración de un compuesto de la presente invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, a un paciente que lo necesite. En una realización adicional, el episodio isquémico es isquemia miocárdica o isquemia cardíaca o isquemia cerebral.

En otro aspecto aún, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de las secuelas de un episodio isquémico. Incluso además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento de las secuelas de un episodio isquémico. Además, las

5 presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las secuelas un episodio isquémico. En una realización adicional, el episodio isquémico es isquemia miocárdica o isquemia cardíaca o isquemia cerebral.

La presente invención proporciona además compuestos para uso en un procedimiento de tratamiento de trastornos de adicción, que comprende la administración de un compuesto de la presente invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, a un paciente que lo necesite. En una realización adicional, el trastorno de adicción implica

10 conductas de consumo, tal como alcohol, tabaco, excesos de alimentación, o uso de drogas ilícitas.

La presente invención proporciona compuestos para uso en un procedimiento para mejorar las consecuencias del estrés que promueve comportamientos adictivos, que comprende la administración de un compuesto de la presente invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, a un paciente que lo necesite. En una realización

15 adicional, los comportamientos adictivos implican conductas de consumo, tal como alcohol, tabaco, excesos de alimentación, o uso de drogas ilícitas.

La presente invención proporciona igualmente un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de trastornos de adicción. Incluso además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo,

20 para uso en el tratamiento de trastornos de adicción. Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de adicción. En una realización adicional, el trastorno de adicción implica conductas de consumo, tal como alcohol, tabaco, excesos de alimentación, o uso de drogas ilícitas.

La presente invención proporciona también un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia, en particular para mejorar las consecuencias del estrés que promueve comportamientos adictivos. En una realización adicional, el trastorno de adicción implica conductas de consumo, tal como alcohol, tabaco, excesos de alimentación, o uso de drogas ilícitas. Incluso además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en mejorar las consecuencias del estrés que promueve comportamientos adictivos. Además, la presente invención proporciona el uso

25 de un compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la fabricación de un medicamento para uso en mejorar las consecuencias del estrés que promueve conductas adictivas. En una realización adicional, los comportamientos adictivos implican conductas de consumo, tal como alcohol, tabaco, excesos de alimentación, o uso de drogas ilícitas.

La presente invención abarca también productos intermedios y procedimientos útiles para la síntesis de un compuesto de la presente invención.

35

El término “para tratamiento” (o “tratar” o “tratamiento”) tal como se usa en la presente invención, se refiere a la restricción, atenuación, detención, o reversión de la progresión o severidad de un síntoma, estado o trastorno existente.

Tal como se usa en la presente invención, el término “reducción de la ganancia de peso”, se refiere a la disminución del incremento en el peso de un paciente. El término “reducción en la recuperación del peso”, se refiere a la disminución en el incremento en el peso de un paciente que experimenta rebote en el peso después de la pérdida de peso. La recuperación de peso puede ser debida a un efecto rebote posterior al cese de la pérdida de peso lograda

40 vía dieta, ejercicio, modificación de la conducta, o terapias aprobadas. Para evitar dudas, la ganancia de peso o recuperación de peso tal como se usa en la presente invención, se refiere a ganancia de peso o recuperación de peso inducida por ingesta de alimentos o hábitos de alimentación y no se refiere a ganancia de peso relacionada con no-alimentos tal como acumulación de fluidos, peso debido a retención de agua, masa muscular, o inflamación.

45

Un “episodio isquémico” tal como se usa en la presente invención, se refiere a un suministro insuficiente de sangre a un órgano o parte del cuerpo. La disminución en el flujo sanguíneo reduce el suministro de oxígeno al órgano afectado o a parte del cuerpo. Un episodio isquémico puede igualmente conocerse como isquemia. Un experto en la técnica sabe que la isquemia puede afectar a diferentes órganos o partes del cuerpo, por ejemplo el corazón, tal como la isquemia miocárdica o isquemia cardíaca, o al cerebro, tal como la isquemia cerebral.

50

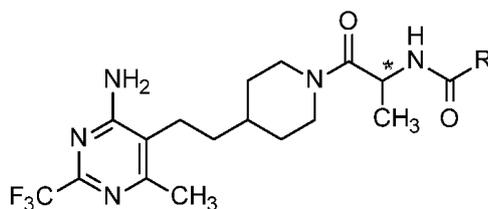
Los “trastornos de adicción”, tal como se usa en la presente invención, describen conductas de inadaptación para las cuales un individuo muestra una incapacidad para controlarlas a pesar de las consecuencias negativas. De particular relevancia para la presente invención, son los trastornos de adicción que implican conductas consumistas tales como ingesta de alcohol, tabaco, excesos de alimentación, y uso de drogas ilícitas. La presente invención normaliza incentivos aberrantes y recompensa a substratos neuronales que están desregulados en individuos con trastornos adictivos. El estrés es frecuentemente un agente precipitante en la etiología y mantenimiento de trastornos adictivos; la presente invención proporciona un procedimiento para mejorar las consecuencias del estrés que promueve las conductas adictivas.

55

Un compuesto de la presente invención puede reaccionar para formar sales aceptables farmacéuticamente. Las sales aceptables farmacéuticamente y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y otros, Handbook of Pharmaceuticals Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2001); S.M. Berge, y otros, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, n°. 1, January 1977.

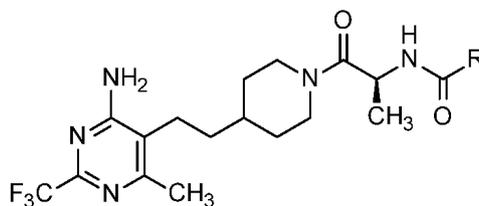
5

El técnico experto comprenderá que el compuesto de la invención, o sales aceptables farmacéuticamente del mismo, están comprendidos por un núcleo que contiene al menos un centro quiral, representado por * en (I) a continuación:



(I)

10 Los compuestos preferidos de la invención están representados por (II):



(II)

o sales aceptables farmacéuticamente de los mismos.

El técnico experto comprenderá que pueden crearse centros quirales adicionales en los compuestos de la invención mediante la selección de ciertas variables. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos, incluyendo racematos.

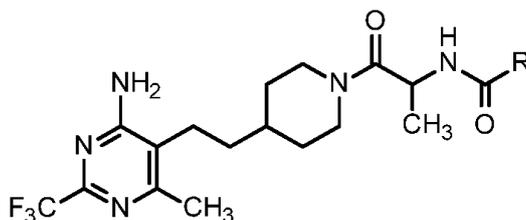
15

El técnico experto comprenderá igualmente que las designaciones (R) o (S) de Cahn-Ingold-Prelog para todos los centros quirales variarán dependiendo de los patrones de sustitución del compuesto particular. Los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden prepararse comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden aislarse a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales convencionales en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la invención. Los enantiómeros individuales de compuestos de la invención son una realización preferente de la invención.

20

Un compuesto de la presente invención está preferiblemente formulado como composiciones farmacéuticas administradas por una diversidad de vías, tal como administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, y otros, eds. 21st ed., Mack Publishing Co., 2005). Más particularmente preferida, es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención representado por la fórmula

25



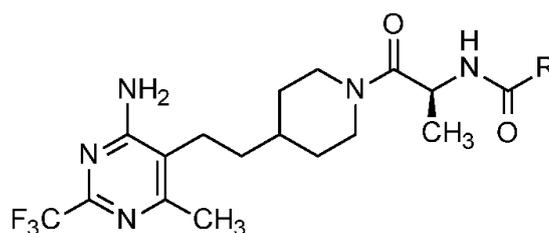
30 en la que R está seleccionado entre alquilo de -C₁-C₃ opcionalmente sustituido con -OH; alquilo de -OC₁-C₄; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en la que cada uno de ellos puede

estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo y uno o más vehículos o diluyentes aceptables farmacéuticamente.

Aunque todos los compuestos ejemplificados de la invención son inhibidores de la GOAT, ciertas clases de compuestos son preferidos. Los párrafos siguientes describen dichas clases preferidas:

- 5 a) R es alquilo de -C₁-C₃ opcionalmente sustituido con -OH; alquilo de -OC₁-C₄; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; o fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃.
- 10 b) R es pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; o fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃.
- c) R es pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃;
- 15 d) R es pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃;
- e) R es piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl;
- f) R es fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃;
- g) R es -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH, -OCH₃, o -OC(CH₃)₃;
- 20 h) R es -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH;
- i) R es -OCH₃ o -OC(CH₃)₃;
- j) R es pirazolilo;
- k) R es pirazolilo sustituido con -CH₃;
- l) el compuesto de la presente invención es la base libre;
- 25 m) el sustituyente metilo adyacente a -NC(O)R está en la configuración S en el compuesto de la presente invención.

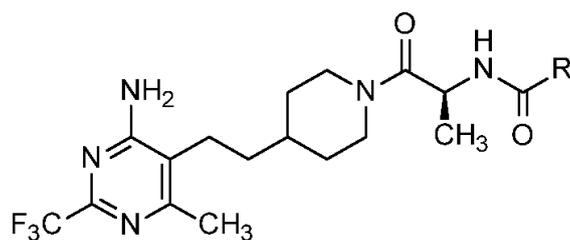
Una realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula



,

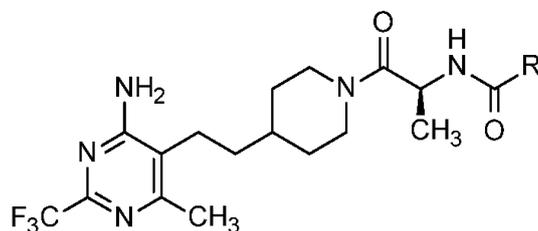
- 30 en la que R está seleccionado entre alquilo de -C₁-C₃ opcionalmente sustituido con -OH; alquilo de -OC₁-C₄; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en la que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



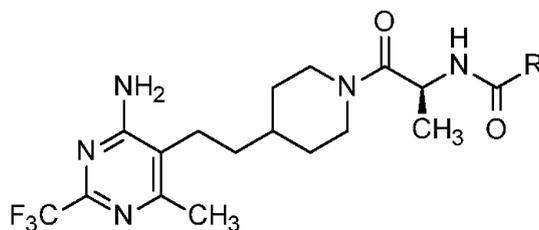
- 5 en la que R está seleccionado entre -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH; -OCH₃ o -OC(CH₃)₃; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en la que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



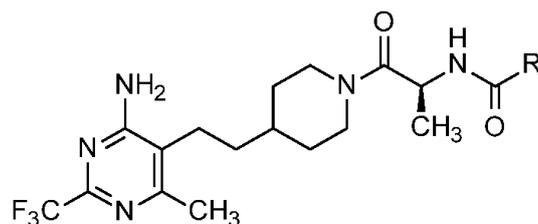
- 10 en la que R está seleccionado entre pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en la que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



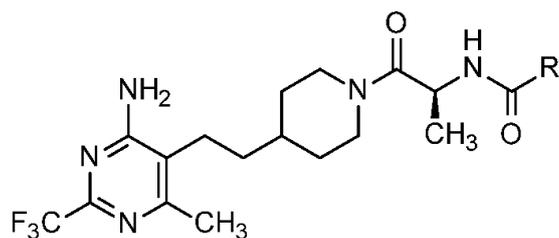
- 15 en la que R está seleccionado entre pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, o piracinilo, en la que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula



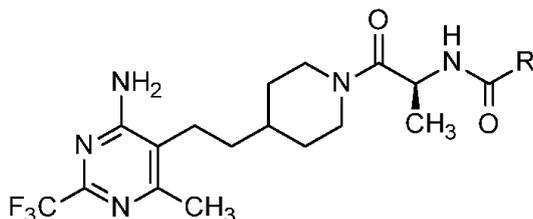
- 20 en la que R está seleccionado entre pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, y tiadiazolilo, en la que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Una realización preferente adicional de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula



en la que R está seleccionado entre piridinilo, piridacnino, y piracnino, en la que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido -Cl; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

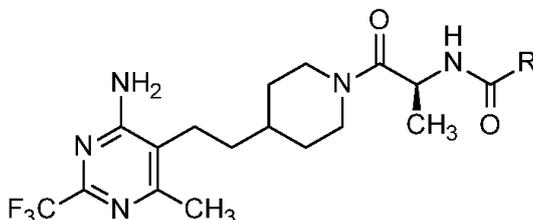
Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



5

en la que R es fenilo opcionalmente sustituido -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

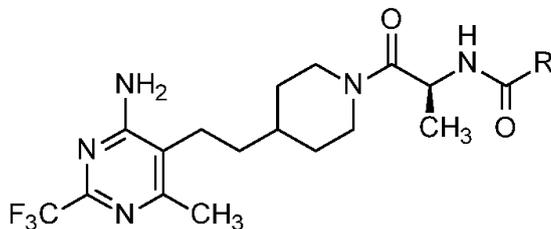
Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



10

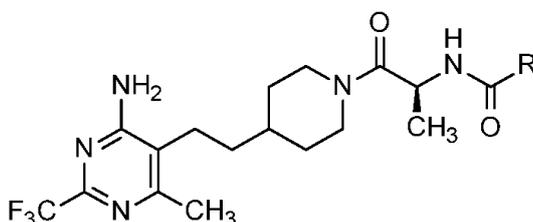
en la que R está seleccionado entre -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH; -OCH₃ y -OC(CH₃)₃; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



en la que R es -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

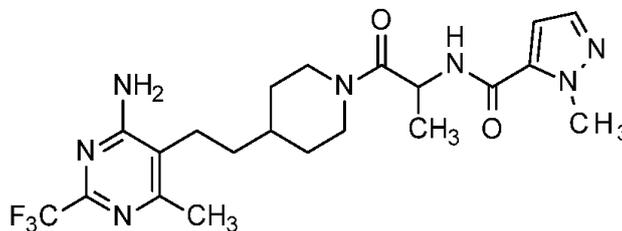
Otra realización preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula siguiente



15

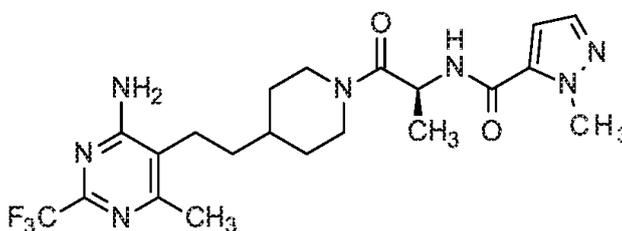
en la que R está seleccionado entre $-OCH_3$ y $-OC(CH_3)_3$; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

Una realización especialmente preferente de la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula:



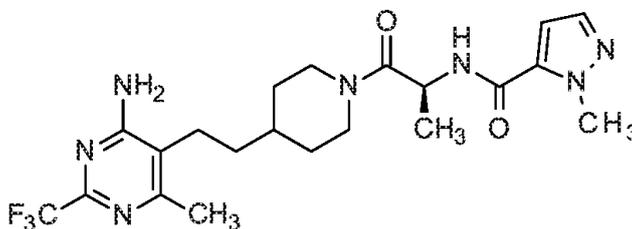
o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma.

- 5 Otra realización especialmente preferente de la presente invención se refiere al compuesto de la fórmula:



o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma.

Una realización adicional especialmente preferente de la presente invención se refiere al compuesto de la fórmula:



- 10 El compuesto de la presente invención es generalmente eficaz dentro de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,03 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los índices de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente mencionado pueden ser más que adecuados, en tanto que, en otros casos, pueden usarse dosis aún mayores, manteniéndose, no obstante, un perfil beneficio/riesgo favorable y, por ello, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar de ninguna manera el alcance de la invención. Se da por entendido que la cantidad del compuesto realmente administrado estará determinada por un médico, a la vista de las circunstancias correspondientes, incluyendo el estado a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto o compuestos real administrado, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

- 15 Es bien sabido en la técnica que los agentes para el tratamiento de la diabetes y/o la obesidad pueden combinarse con otros agentes para el tratamiento de la diabetes y/o la obesidad. El compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, puede co-administrarse, simultáneamente o secuencialmente, con otro tratamiento(s) eficaz para la diabetes o la obesidad. El compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, solo o en combinación con otro tratamiento(s) eficaz puede administrarse, simultáneamente o secuencialmente, siguiendo procedimientos médicos aprobados tales como cirugías bariátricas, por ejemplo, cirugía de bypass gástrico o procedimientos de bandas gástricas ajustables.

- 20 Los compuestos de la invención, o sales de los mismos, pueden prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los Esquemas, Preparaciones, Ejemplos más adelante. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes formas, o conjuntamente con etapas procedentes de diferentes esquemas, para preparar compuestos o sales de la presente invención. Los productos de cada etapa en los Esquemas de más adelante pueden recuperarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, y cristalización. En los Esquemas de más adelante, todos los sustituyentes salvo que se

indique lo contrario, son tal como previamente se han definido. Los reactivos y materiales de partida se encuentran fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica.

Adicionalmente, ciertos compuestos intermedios descritos en los Esquemas siguientes pueden contener uno o más grupos de protección de nitrógeno. El grupo de protección variable puede ser el mismo o diferente en cada situación, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y de las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas para un técnico experto y están descritas en la literatura (Véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Syntheses", Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

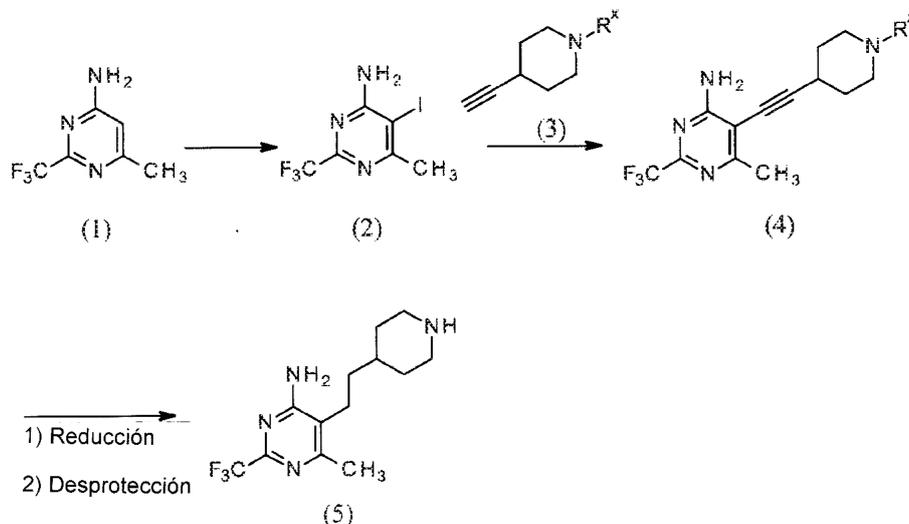
Ciertos centros estereoquímicos se han dejado sin especificar y ciertos sustituyentes han sido eliminados en los Esquemas siguientes por motivos de claridad y no pretenden, de ningún modo, limitar la exposición de los Esquemas. Los enantiómeros y diastereómeros individuales pueden prepararse empezando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, los enantiómeros o racematos individuales pueden aislarse de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales convencionales en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la invención, mediante procedimientos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, J. Jacques, y otros, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).

Algunos compuestos intermedios o compuestos de la presente invención pueden tener uno o más centros quirales. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos, incluyendo racematos. Se prefiere que los compuestos de la presente invención que contienen al menos un centro quiral existan en forma de un enantiómero o diastereómero individual. El enantiómero o diastereómero individual puede prepararse empezando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden aislarse de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales convencionales. El técnico experto comprenderá que, en algunas circunstancias, el orden de elución de enantiómeros o diastereómeros puede ser diferente debido a las diferentes columnas y fases móviles cromatográficas.

Ciertas abreviaturas se definen tal como sigue a continuación: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a Albúmina de Suero Bovino; "DCC" se refiere a 1,3-diciclohexilcarbodiimida; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIC" se refiere a diisopropilcarbodiimida; "DIPEA" se refiere a diisopropildietilamina o N-etil-N-isopropil-propan-2-amina; "DMAP" se refiere a dimetilaminopiridina; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDC" se refiere a hidrocioruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "ELISA" se refiere a ensayo inmunoenzimático; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol o alcohol etílico; "Ej" se refiere a ejemplo; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HATU" se refiere a hexafluorofosfato de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3*H*-[1,2,3]tdazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)metanimio; HOAt" se refiere a 1-hidroxi-7-azobenzotriazol; "HOBt" se refiere a hidrato de 1-hidroxilbenzotriazol; "HBTU" se refiere a hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotdazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta eficacia; "HRP" se refiere a peroxidasa de rábano picante; "IC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para dicho agente; "LC-ES/MS" se refiere a cromatografía líquida-electrospray/espectrometría de masa; "min" se refiere a minuto o minutos; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "MS" se refiere a espectrometría de masa; "OAc" se refiere a acetato; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "PG" se refiere a grupo de protección; "Prep" se refiere a preparación; "PYBOP®" se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxipirrolidino-fosfonio; "PYBROP®" se refiere a hexafluorofostato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "SCX" se refiere a intercambio de catión fuerte; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos en fase supercrítica; "SPE" se refiere a extracción en fase sólida; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "TMB" se refiere a 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, y "T_R" se refiere a tiempo de retención.

En los Esquemas que siguen a continuación, todos los sustituyentes, salvo que se indique lo contrario, son tal como previamente se han definido. Los reactivos y materiales de partida se encuentran fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica. Otros pueden hacerse mediante técnicas convencionales de química orgánica y de heterocíclicos, las cuales son análogas a las síntesis de compuestos similares estructuralmente y los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos que siguen incluyen cualquier nuevo procedimiento.

Esquema 1

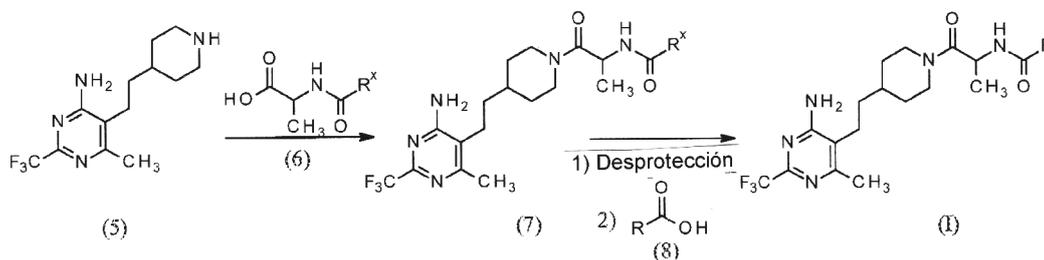


En el Esquema 1, R^x es un grupo de protección amina apropiado. Los grupos de protección amina son bien conocidos y apreciados en la técnica, y pueden incluir carbamatos y amidas. Un experto en la técnica reconocerá reactivos y procedimientos alternativos para agregar y separar dichos grupos de protección.

El compuesto (2) puede prepararse tratando el compuesto (1) con un agente de halogenación, tal como monoclóruo de yodo, I_2 , o N-yodosuccinimida. Un experto en la técnica admitirá que existe un cierto número de procedimientos de halogenación heteroaromática. En una etapa adicional, el compuesto (4) puede prepararse mediante emparejamiento del compuesto (2) con un alquino (3) bajo condiciones de emparejamiento convencionales, usando un reactivo organometálico obtenido del paladio, tal como $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, $Pd(OAc)_2$, o $Pd_2(dba)_3$, en la presencia de un catalizador, tal como CuI , y una base, tal como Et_3N , DIPEA, K_2CO_3 , o Cs_2CO_3 . Un experto en la técnica admitirá que existen reactivos organometálicos alternativos obtenidos de metales tales como Cu o Zn . Como alternativa, la amina libre correspondiente del compuesto (3) puede adquirirse y protegerse mediante un grupo de protección amina apropiado. El compuesto (4) se reduce mediante hidrogenación catalítica en la presencia de un catalizador de metal de transición tal como óxido de platino. Otros catalizadores de hidrogenación son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, el paladio sobre carbón o derivados de rodio, para reducir alquinos. Un experto en la técnica admitirá que existen otros procedimientos para la reducción de alquinos, incluyendo el tratamiento con sodio en etanol o cinc en ácido. A continuación, el grupo de protección puede separarse bajo condiciones bien conocidas en la técnica, tales como bajo condiciones ácidas o básicas, para proporcionar el compuesto (5).

20

Esquema 2



El compuesto (7) puede sintetizarse mediante la reacción del compuesto (5) con el compuesto (6) bajo condiciones de emparejamiento convencionales. Un experto en la técnica admitirá que existe un cierto número de procedimientos y reactivos para la formación de amida resultantes de la reacción de ácidos carboxílicos y aminas. El emparejamiento del compuesto (5) con el compuesto (6) puede efectuarse en la presencia de un reactivo de emparejamiento adecuado y una base amina adecuada, tal como DIPEA o trimetilamina. Los reactivos de emparejamiento incluyen carbodiimidas, tales como DCC, DIC, EDCI, y otros reactivos de emparejamiento, tal como HOBt y HOAt. Adicionalmente, pueden usarse sales de uronio o fosfonio de aniones nucleofílicos, tales como HATU, HBTU, PYBOP®, y PYBROP®, en lugar de los reactivos de emparejamiento más tradicionales. Pueden usarse aditivos tal como DMAP para potenciar las reacciones. Como alternativa, el compuesto (5) puede acilarse usando cloruro de acilo sustituido del compuesto 8) en la presencia de una base, tal como trietilamina o piridina.

30

El grupo de protección, R^x, en el compuesto intermedio (7), puede separarse bajo condiciones bien conocidas en la técnica, tales como condiciones ácidas o básicas. El compuesto intermedio amina resultante puede hacerse reaccionar con el compuesto (8) bajo condiciones de emparejamiento convencionales, incluyendo las previamente descritas en la preparación del compuesto (7), para obtener un compuesto de Fórmula (I). El técnico experto admitirá que existen procedimientos alternativos para preparar un compuesto de Fórmula (I) a partir del compuesto desprotegido (7), incluyendo la reacción con un cloruro de ácido en la presencia de una base orgánica, tal como trietilamina, o con un anhídrido en la presencia de un catalizador, tal como DMAP.

En una etapa opcional, puede formarse una sal aceptable farmacéuticamente de un compuesto de la Fórmula (I), mediante la reacción de una base libre apropiada de Fórmula (I) con un ácido aceptable farmacéuticamente apropiado en un disolvente adecuado bajo condiciones convencionales. Adicionalmente, la formación de dichas sales puede producirse simultáneamente mediante desprotección de un grupo de protección de nitrógeno. La formación de dichas sales es bien conocida y apreciada en la técnica.

Preparaciones y Ejemplos

Las Preparaciones y Ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención y representan síntesis típicas del compuesto de la invención. Los reactivos y materiales de partida se encuentran fácilmente disponibles o pueden ser sintetizados fácilmente por un experto normal en la técnica. Se sobrentiende que las Preparaciones y Ejemplos se establecen a modo de ilustración y no de limitación, y que pueden ser hechas diversas modificaciones por un experto normal en la técnica.

La configuración R o S del compuesto de la invención puede determinarse mediante técnicas convencionales tales como análisis mediante rayos X y correlación con tiempo de retención en HPLC quiral. La denominación de las Preparaciones y Ejemplos siguientes se ha realizado generalmente usando la denominación característica de la IUPAC en la MDL ACCELERYS® Draw versión 4.1.

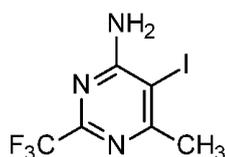
La LC-ES/MS se realizó sobre un sistema de cromatografía líquida AGILENT® HP1100. Las mediciones de espectrometría de masa por electrospray (captadas en modo positivo) se realizaron sobre un espectrómetro de masas cuadrupolar Mass Selective Detector con interfaz al HPLC HP1100. Condiciones de la LS-MS (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,1 x 50 mm, 3,0 μm; gradiente: 5-100% de B en 3 min, a continuación, 100% de B para 0,75 min; temperatura columna: 50°C +/- 10°C; velocidad de flujo: 1 ml/min; disolvente A: agua desionizada con 0,1% de ácido fórmico; disolvente B: ACN con 0,1% de ácido fórmico. Condiciones alternativas para la LC-MS (pH bajo): columna: columnas XTERRA® MS C18 2,1 x 50 mm, 3,5 μm; gradiente 5% de disolvente A para 0,25 min, gradiente desde 5% hasta 100% de disolvente B en 3 min y 100% de disolvente B para 0,5 min o 10% a 100% de disolvente B en 3 min y a 100% de disolvente B para 0,75 min; temperatura de columna: 50°C +/- 10°C; velocidad de flujo: 1 ml/min; disolvente A: bicarbonato amónico 10 mM, pH 9; disolvente B: ACN; longitud de onda: 214 nm.

Todas las cromatografías de fase inversa preparativas se realizaron sobre un LC/MS AGILENT® 1200 equipado con un espectrómetro de masas Mass Selective Detector y un autosacamuestras/recogedor de fracciones LEAP®. Los procedimientos a pH alto se llevaron a cabo sobre una columna de 5 μ de tamaño de partícula PHENOMENEX® GEMINI® NX de 75 x 30 mm, con una protección de 10 x 20 mm. Velocidad de flujo de 85 ml/min. El eluyente era bicarbonato amónico 10 mM (pH 10) en acetonitrilo.

Se usó un espectrómetro de masas Waters ZQ y un detector de red de diodos 29998 para la captación de datos de masa y UV durante la cromatografía de fluidos en fase supercrítica (SFC). El material que mostró la masa (ionización por electrospray) y absorbancia UV correcta se recogió.

Preparación 1

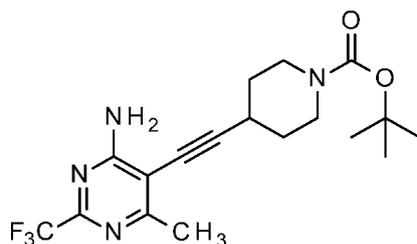
5-yodo-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina



Agregar una solución de monoclóruo de yodo (4,14 g, 23,37 mmol) en DCM (20,1 ml) a un matraz conteniendo 6-metil-2-trifluorometil-pirimidin-4-amina (4,14 g, 23,37 mmol) en MeOH (1,4 ml). Agitar la mezcla de temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez completada la reacción, agregar solución de sulfito sódico acuoso al 10% (200 ml). Extraer la mezcla resultante con EtOAc (4 x 100 ml), secar la fase orgánica sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar bajo vacío para obtener el compuesto del epígrafe bruto en forma de un sólido de color amarillo claro (7,0 g, 99%). Usar el material sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 303,8 (M+H).

Preparación 2

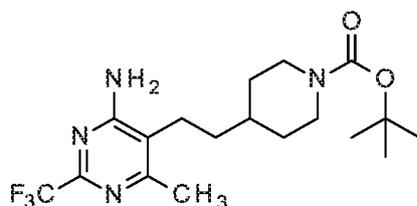
4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etnil]piperidino-1-carboxilato de *tert*-butilo



5 Formar una suspensión de 5-yodo-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (2,05 g, 6,75 mmol), éster *terc*-butílico del ácido 4-etinil-piperidino-1-carboxílico (1,41 g, 6,75 mmol), cloruro de bis(trifenilfosfino)paladio(II) (239 mg, 0,34 mmol) y yoduro de cobre(I) (130 mg, 0,68 mmol) en 10 ml de DMF en un vial de microondas de 20 ml y borbotear nitrógeno a través de la suspensión durante 5 minutos. Agregar trietilamina (1,88 ml, 13,5 ml) y continuar borboteando nitró a través de la mezcla durante 5 minutos adicionales. Calentar la mezcla en un microondas a 100°C durante 60 minutos. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y verterla en NaCl acuoso saturado (500 ml). Extraer con DCM, secar la capa orgánica sobre MgSO₄, filtrar y concentrar bajo vacío. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice (5-35% EtOAc:hexanos durante 45 minutos). Concentrar las fracciones purificadas hasta sequedad para obtener el compuesto del epígrafe (1,25 g, 48%) en forma de un sólido de color amarillo claro. LC-ES/MS *m/z* 385,2 (M+H).

Preparación 3

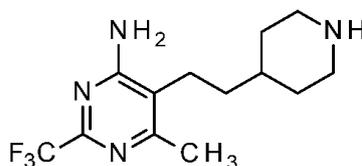
4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]piperidino-1-carboxilato de *terc*-butilo



15 Combinar 4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]piperidino-1-carboxilato de *terc*-butilo (6,28 g, 16,34 mmol) y óxido de platino(IV) (744 mg, 3,27 mmol) en EtOH (110 ml). Alternadamente vaciar y cargar el matraz con hidrógeno bajo un balón de hidrógeno, llenar el sistema con hidrógeno y agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas, lavar con EtOH (30 ml) caliente seguido de NH₃ 2M/MeOH (20 ml). Concentrar la solución bajo presión reducida para obtener el compuesto del epígrafe (6,15 g, 97%) en forma de un sólido de color blanco. Usar sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 389,2 (M+H).

Preparación 4

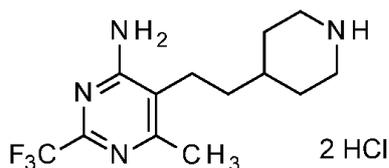
6-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina



25 Disolver 4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]piperidino-1-carboxilato de *terc*-butilo (6,07 g, 15,63 mmol) en DCM (25 ml) y agregar TFA (10 ml, 132,25 mmol). Agitar la solución durante 4 horas a temperatura ambiente. Concentrar la mezcla bajo presión reducida, disolver el residuo resultante en DCM (15 ml) y aplicar a una columna de SCX (50 g), eluyendo con DCM (100 ml) MeOH (100 ml), y eluyendo el material deseado con NH₃ 2 M /MeOH (100 ml). Evaporar las fracciones de amoníaco metanólico hasta sequedad, para obtener el compuesto del epígrafe (4,4 g, 97%), en forma de un sólido de color blanquecino. Usar sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 289,2 (M+H).

Preparación 5

Dihidrocloreuro de 6-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina



- 5 Agregar cloruro de acetilo (180,1 ml) en una corriente constante lenta a una solución a 50°C de isopropanol (1,26 litros) y agitar a 50°C durante 30 minutos. Agregar en forma de porciones 4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]piperidino-1-carboxilato de *terc*-butilo (180,1 g, 463,7 mmol) procedente de la Preparación 3 y continuar calentando durante 1,5 horas. Enfriar a temperatura ambiente y agregar dietil éter (3,6 litros). Recoger el sólido mediante filtración y lavar con dietil éter (2 x 300 ml). Secar el sólido resultante en una estufa de vacío a 50°C durante una noche, para obtener el compuesto del epígrafe (174,0 g, 98%) en forma de un polvo fluido de color blanco. Usar sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 289,2 (M+H).

Ejemplo 1

- 10 *N*-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]carbamato de *terc*-butilo



- 15 Disolver 6-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (3,9 g, 13,53 mmol) en DMF (20 ml); agregar ácido (2*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanoico (2,8 g, 14,88 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (7,46 g, 54,11 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2,63 g, 13,53 mmol) y diisopropiletilamina (7,08 ml, 40,58 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche. Verter la mezcla de reacción en NaHCO₃ acuoso saturado (500 ml) y extraer con DMC. Secar la fase orgánica sobre MgSO₄, filtrar, concentrar bajo vacío y purificar mediante cromatografía de gel de sílice (10-75% de EtOAc:hexanos en 45 minutos) para obtener, después de separación del disolvente, el compuesto del epígrafe (4,66 g, 75%) en forma de una espuma de color blanco. LC-ES/MS *m/z* 460,2 (M+H).

- 20 **Procedimiento alternativo para el Ejemplo 1**

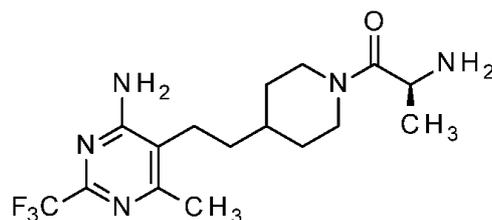
N-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]carbamato de *terc*-butilo



- 25 Agregar diisopropiletilamina (308,6 ml, 1770 mmol) a una suspensión de dihidrocloreto de 6-metil-5-[2-(4-piperidil)etil]-2-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (170 g, 442,4 mmol), ácido (2*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanoico (92,1 g, 486,6 mmol) en DCM (1,6 litros) para obtener una suspensión de color amarillo pálido. Enfriar a 0°C en un baño de hielo y agregar en forma de porciones hexafluorofosfato de (dimetilamino)-*N,N*-dimetil(3*H*)-[1,2,3]-triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)metanimio (167,3 g, 442,4 mmol). Agitar la suspensión de color amarillo brillante a 0°C durante 30 minutos y calentar a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas. Concentrar hasta cerca de 1 litro bajo presión reducida y diluir la mezcla de reacción con EtOAc (1 litro) y separación con NH₄Cl acuoso saturado (cerca de 500 ml); separar la capa orgánica y extraer nuevamente la capa acuosa con EtOAc (2 x 500 ml). Combinar las fases orgánicas, lavar con NH₄Cl acuoso saturado (4 x 400 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (400 ml), agua (400 ml), NaCl acuoso saturado (400 ml). Secar sobre MgSO₄, filtrar y concentrar bajo presión reducida, formando un azeótropo con iso-hexanos (750 ml) para obtener el compuesto del epígrafe (237 g, 99%) en forma de una espuma de color blanco, adecuada para uso sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 460,32 (M+H). Análisis quiral (SFC NibiGram®, MeOH al 15%/CO₂/iso.propilamina al 0,2%, 5 ml/min, 10.000 kPa, 35°C, 220 mm) >98% ee.

Preparación 6

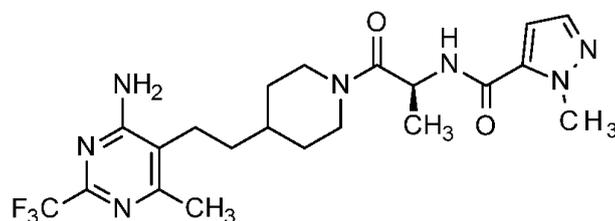
(2*S*)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona



- 5 Disolver *N*-[(1S)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]carbamato de *terc*-butilo (4,66 g, 10,14 mmol) en DCM (150 ml) y agregar ácido trifluoroacético (7,67 ml, 101,4 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche. Concentrar el disolvente bajo vacío, reconstituir el residuo en DCM (20 ml) y aplicar a una columna de SCX (50 g), eluyendo con 100 ml de DCM, 100 ml de MeOH, y eluyendo el material deseado con NH₃ 2 M/MeOH (100 ml). Evaporar las fracciones de amoníaco metanólico hasta sequedad para obtener el compuesto del epígrafe (3,58 g, 98%) en forma de una espuma de color blanco. Usar sin purificación adicional. LC-ES/MS *m/z* 360,2 (M+H).

Ejemplo 2

- 10 *N*-[(1S)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]-2-metil-pirazol-3-carboxamida



- 15 Disolver (2S)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona (560 mg, 1,56 mmol) en DCM (20 ml) conteniendo DMF (3 ml); agregar ácido 1-metil-1*H*-pirazolo-5-carboxílico (216 mg, 1,71 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (969 mg, 6,23 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (303 mg, 1,56 mmol) y diisopropiletilamina (1,36 ml, 7,8 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche. Verter la mezcla de reacción en NaHCO₃ acuoso saturado (200 ml) y extraer con DCM. Secar la fase orgánica con MgSO₄, filtrar, concentrar bajo vacío y purificar mediante cromatografía de gel de sílice (0-10% de MeOH:DCM en 30 minutos) para obtener, después de separación del disolvente, el compuesto del epígrafe (665 mg, 91%) en forma de una espuma de color blanco. LC-ES/MS *m/z* 468,0 (M+H).

Preparar los Ejemplos en la Tabla 1 a continuación, siguiendo esencialmente el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, usando (2S)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona y el ácido carboxílico sustituido apropiado.

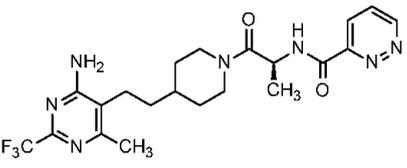
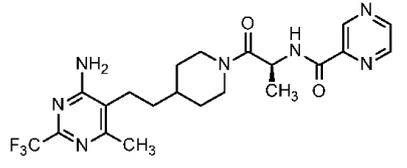
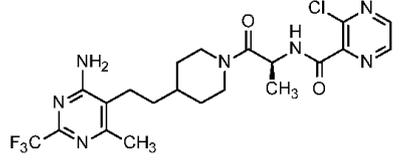
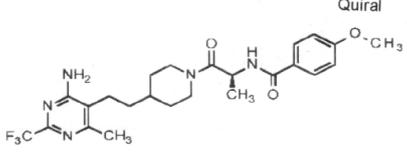
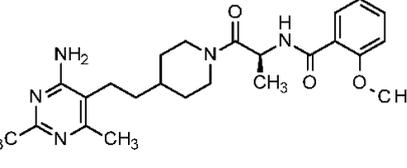
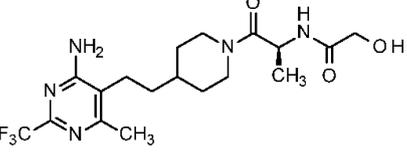
Tabla 1

Ej. No.	Estructura	Nombre	Rendimiento	ES/MS <i>m/z</i> (M+H)
3		<i>N</i> -[(1S)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]-1-metil-pirazol-4-carboxamida	58%	468,3
4		<i>N</i> -[(1S)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida	43%	468,3

Tabla 1 (Cont.)

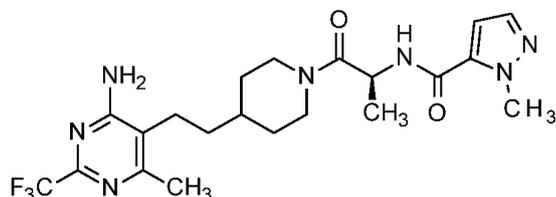
Ej. No.	Estructura	Nombre	Rendimiento	ES/MS m/z (M+H)
5		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-1,3-dimetil-pirazol-4-carboxamida	61%	482,3
6		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-2-metil-oxazol-4-carboxamida	10%	468,6
7		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-2-metil-tiazol-4-carboxamida	59%	484,6
8		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-2-metil-tiazol-5-carboxamida	58%	485,0
9		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]tiadiazol-4-carboxamida	64%	471,6
10		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]piridino-2-carboxamida	89%	465,2
11		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]piridino-3-carboxamida	62%	465,3

Tabla 1 (Cont.)

Ej. No.	Estructura	Nombre	Rendimiento	ES/MS m/z (M+H)
12		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]piridacina-3-carboxamida	11%	466,0
13		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]piridacina-2-carboxamida	67%	466,2
14		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-6-cloropiridacina-2-carboxamida	12%	500,3/502.3 (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
15		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-3-cloropiridacina-2-carboxamida	49%	500,3/502.3 (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
16		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-4-metoxibenzamida	62%	494,2
17		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-2-metoxibenzamida	74%	494,3
18		<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxietil]-2-hidroxiacetamida	99%	418,2

Procedimiento alternativo para el Ejemplo 2

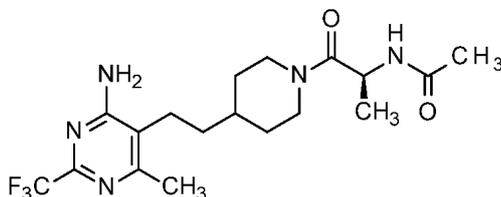
N-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]-2-metil-pirazol-3-carboxamida



5
10
15
Agregar una corriente constante, lenta, de anhídrido cíclico del ácido 1-propanofosfónico (410,6 ml, 683,9 mmol) a una lechada de (2*S*)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona (168,0 g, 342,0 mmol), ácido 1-metil-1*H*-pirazolo-5-carboxílico (64,7 g, 513,0 mmol) y diisopropiletilamina (244,5 ml, 1400 mmol) suspendida en DCM (1,5 litros) en un baño de hielo, manteniendo la temperatura interna a 5-10°C. Calentar a temperatura ambiente con agitación durante 2,5 horas. Concentrar hasta cerca de 500 ml bajo presión reducida y diluir el residuo resultante con EtOAc (2 litros) y agua (1 litro); separa las capas, extraer la capa acuosa con EtOAc (2 x 400 ml) y lavar las capas orgánicas combinadas con NH₄Cl saturado (500 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (1 litro), agua (500 ml), NaCl acuoso saturado (500 ml). Secar la capa orgánica sobre MgSO₄, filtrar, evaporar bajo presión reducida. Disolver el residuo resultante en acetato de isopropilo (180 ml), tratar con heptanos (1 litro) y calentar a 70°C durante 4 horas para desalojar un polvo blanco. Enfriar a temperatura ambiente, recoger los sólidos mediante filtración, lavar con heptano:acetato de isopropilo 9:1 (100 ml) seguido de heptanos (2 x 100 ml). Secar en estufa de vacío a 45°C durante una noche para obtener el compuesto del epígrafe en forma de un polvo de color blanco. LC-ES/MS *m/z* 468,0 (M+H).

Ejemplo 19

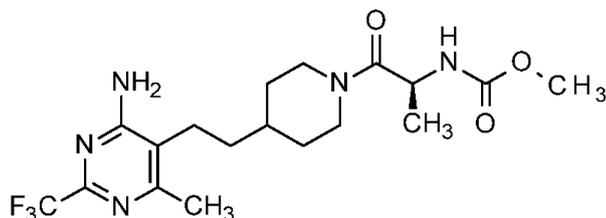
20 *N*-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]acetamida



25 Preparar el compuesto del epígrafe (47,7 mg, 67%) siguiendo esencialmente el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, usando (2*S*)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-cloro-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona (70 mg, 0,19 mmol), anhídrido acético (184,1 µl, 1,95 mmol) y DMAP (1,2 mg, 0,01 mmol) en DCM (3,9 ml, 0,05 M). LC-ES/MS *m/z* 402,2 (M+H).

Ejemplo 20

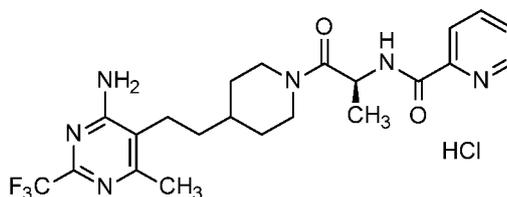
N-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]carbamato de metilo



30 Disolver (2*S*)-2-amino-1-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]propan-1-ona (43,8 mg, 0,12 mmol) en DCM (3 ml) y agregar dicarbonato de dimetilo (22,0 µl, 182,8 µmol) y piridina (30 µl, 365,6 µmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche, verter en NaCl acuoso saturado (100 ml) y extraer con DCM (3 x 30 ml). Lavar las capas orgánicas combinadas con HCl 0,1 N (2 x 100 ml), agua (100 ml), NaCl acuoso saturado (100 ml), secar sobre MgSO₄, filtrar y concentrar bajo presión reducida para obtener el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanquecino (22 mg, 43%). LC-ES/MS *m/z* 418,2 (M+H).

35 **Ejemplo 21**

Hidrocloruro de *N*-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]piridino-2-carboxamida



- 5 Disolver *N*-[(1*S*)-2-[4-[2-[4-amino-6-metil-2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-1-piperidil]-1-metil-2-oxoetil]piridino-2-carboxamida (69 mg, 0,15 mmol) en DCM (1 ml) y agregar HCl (1 M en dioxano, 500 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos y, a continuación, concentrar bajo vacío. Triturar el residuo resultante con DCM (1 ml) seguido de Et₂O (2 ml). Filtrar y recoger el sólido de color amarillo resultante para obtener el compuesto del epígrafe (74 mg, 98%). LC-ES/MS *m/z* 465,2 (M+H).

Ensayos

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

- 20 El papel de la GOAT está soportado por los fenotipos observados en ratones exentos del gen GAOT. En consecuencia, la inhibición de la GOAT es de esperar que disminuya la circulación de la AG y aumente la circulación de la UAG. En consecuencia, la relación de AG con respecto a la grelina total (UAG + AG) se reduce después del tratamiento inhibitor de la GOAT.

Ensayo enzimático de GAOT humana libre de célula *in vitro*

- 25 El gen de GOAT humana (Número de Registro: NM-001100916) se subclonó al vector de expresión de baculovirus pAN51. La cepa de baculovirus se preparó siguiendo el protocolo Bac-to-Bac proporcionado por el vendedor, Invitrogen, California, USA. Se agregaron cinco mililitros de cepa de baculovirus de GOAT humana a 500 ml de células Sf9 en medio HyQ SFX-Insect™ (HyClone, número de catálogo SH30278.02) a una densidad de 1 x 10⁶ células por mililitro en un matraz Erlenmeyer de 2 litros. El matraz con gen de GAOT humana infectada con células Sf9 se colocó sobre un sacudidor de placas a 120 rpm a 28°C durante 48 horas. Después de 48 horas de incubación, las células se centrifugaron a 1.000xg durante 10 minutos a 4°C. Los gránulos de células se recogieron y almacenaron a -80°C en un congelador hasta estar listas para su posterior procesado.

Preparación de membrana microsomal de enzima de GOAT para el ensayo enzimático

- 35 Se suspendió un gramo de gránulos de células en 9 ml de tapón de homogeneización enfriado (Tris-HCl 50 mM, sacarosa 250 mM, ajustado a pH 7,5 y filtrado de forma estéril a través de un filtro Millipore de 0,2 µm). La suspensión de células se transfirió a un homogeneizador de vidrio Dounce. Los gránulos de células se homogenizaron con 40 golpes sobre hielo. El homogenato se centrifugó a 3.000 rpm en un rotor flotante Beckman a 4°C durante 10 minutos para separar las células no rotas. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 40.000xg durante 1 hora a 4°C. El gránulo de membrana resultante se suspendió en el tampón de homogeneización usando un homogeneizador de vidrio Dounce y se almacenó a -20°C en el congelador para el ensayo. Para el almacenaje a largo plazo de la preparación de membrana de enzima de GOAT humana, la membrana suspendida se almacenó en un congelador a -80°C.

Preparación del ensayo enzimático de GOAT humana

- 45 Preparar los compuestos de ensayo en DMSO para obtener una solución madre de 0,2 mM. Diluir de manera seriada la solución madre en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con una concentración del compuesto final dentro del intervalo de desde 10 µM hasta 0,5 nM en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Preparar la enzima y las soluciones substrato en tampón de ensayo (TWEEN-20 al 0,02% en Tris 50 mM, pH 7,5/sacarosa 250 mM/1 mg/ml de BSA /EDTA 10 mM). Agregar el compuesto diluido (1 µl) a cada pocillo de la fila A a N de una placa de 384 pocillos de unión baja en proteína correspondiente. Agregar mezcla de substrato de GOAT humana (10 µl), consistente en desacil-grelina-biotina humana (CPC Scientific Inc., 6,0 µM final), octanoil-coenzima A (CoA) (Sigma, 60 µ final) y un anticuerpo específico de la AG (Patente WO 2006/091381) (1,0 µg/ml final), a los compuestos. Agregar preparación de enzima de GOAT-His(sf9, que ha sido preparada en tampón de ensayo (9 µl), a cada pocillo de la placa que contiene el substrato y los compuestos de ensayo dando como resultado una concentración

final de 0,01 µg/ml para iniciar la reacción. Incubar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un oscilador rotatorio suavemente. Agregar hidrocloreuro de guanidina 4 M (20 µl) a todos los pocillos, mezclar e incubar durante 3 horas para parar la reacción.

5 Preparar placas ELISA (STREPTAVIDIN SPECTRAPLATE™ 384, Perkin Elmer) mediante bloqueo con FBS térmicamente inactivado al 2% en tampón de bloqueo PBS (40 µl) (Invitrogen) durante 3 horas. Aspirar el tampón de bloqueo procedente de la placa ELISA y agregar tampón de bloqueo (23 µl) a las columnas 1-24, filas A-N. Reservar las filas O y P para la curva patrón de acilgrelina. Agregar la mezcla de reacción (2 µl) a las placas ELISA. Preparar una curva patrón de 10 puntos (octanoil-grelina marcada con biotina) mediante dilución en serie 2X en tampón de bloqueo conteniendo hidrocloreuro de guanidina 0,2 M partiendo de 2,5 pM. Incubar la mezcla de reacción o el patrón de AG marcado con biotina en la placa ELISA durante una noche a 4°C. Al día siguiente, lavar la placa 3x con tampón de lavado (TWEEN™-20 al 0,1%/PBS, 100 µl por pocillo en cada ciclo de lavado). Agregar anticuerpo específico de AG (Patente WO 2006/091381) (25 µl de 0,5 µg/ml en tampón de bloqueo) a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Lavar la placa 3x con un tampón de lavado, de manera similar a la etapa anterior. Agregar proteína G-HRP (25 µl) (Southern Biotech), diluir 3.000x en tampón de bloqueo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar el último 3x con tampón de lavado, como en las etapas anteriores. Agregar reactivo TMB (25 µl) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) a cada pocillo y dejar desarrollar durante 20 minutos y parar con ácido fosfórico 1 M (25 µl por pocillo). Leer las placas a 450 nm usando un lector de placas ENVISION® Multilabel. Los niveles de AG se calcularon frente a una curva patrón ajustada y se calcularon los por cientos de inhibición. La curva de inhibición de 10 puntos se representó y ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores IC₅₀ usando la ACTIVITYBASE® (ver. 7.3.2.1).

20 Siguiendo un protocolo esencialmente tal como se ha descrito anteriormente, la totalidad de los compuestos de los Ejemplos de la presente invención se ensayaron y mostraron una IC₅₀ para el ensayo enzimático de la GAOT humana libre de célula *in vitro* menor de 1 µM. Los compuestos ejemplificados siguientes de la invención se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y mostraron la actividad siguiente tal como se ilustra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Ej No.	IC ₂₀ (nM)
2	69,5 ± 0,6 (n=2)
15	55,7 (n=1)
17	420 (n=1)
18	276 (n=1)
20	615 (n=1)

Los datos en la Tabla 2 demuestran que los compuestos de la Tabla 2 inhiben la actividad de la enzima de la GOAT purificada *in vitro*.

30 La comparación del cambio en la relación de AG con respecto a la grelina total en el grupo tratado con compuesto y el del grupo tratado con vehículo refleja el grado de inhibición de la enzima de la GOAT *in vivo*, debido al procesamiento dinámico de UAG a AG por la enzima de la GOAT. En los estudios farmacodinámicos *in vivo* en la presente invención, los índices de AG y UAG en plasma y estómago en los grupos tratados con vehículo y compuesto se midieron mediante ELISA específicamente a estos dos analitos. El índice de grelina total de cada muestra se computó como la suma de AG y UAG mediante estas mediciones ELISA. La relación de AG con respecto a la grelina total se definió por el índice de AG en cada muestra dividido por el índice de grelina total en la misma muestra. Los índices de AG, UAG y la relación de AG con respecto a la grelina total en el grupo tratado con vehículo se computó y fijó como 100%. A continuación, se computó el cambio relativo de estos parámetros en el grupo tratado con compuesto para determinar la eficacia del compuesto de ensayo.

40 Estudio de ensayo de 3 días dependiente de la dosis *in vivo* para el inhibidor E de la GOAT

Animales y tratamiento

45 Comprar ratones C57BL/6 macho de Harlan (Indianapolis, IN) de 9 semanas de edad. Alojarse los ratones individualmente en una instalación con temperatura controlada (24°C) con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas 2200 h), y dejar acceso libre a alimento para roedores convencional (dieta 2014, Harlan) y agua. Típicamente, usar los ratones cuando tengan 10-13 semanas de edad en el momento del estudio. El día 0 del experimento, distribuir aleatoriamente los ratones dentro de los grupos de tratamiento (N=7/grupo) de manera que cada grupo tenga pesos corporales medios similares. El día 1 y el día 2, tratar los animales con vehículo (hidroxietilcelulosa al 1%,

TWEEN™ 80 al 0,25%, antiespuma al 0,05%) o compuesto de ensayo preparado en el vehículo como suspensión a varias dosificaciones para alimentación oral por sonda a las 7 am y 7 pm. El día 3, dejar en ayunas a los animales, trasladarlos dentro de jaulas limpias y dosificarlos con el vehículo o con el compuesto de ensayo nuevamente a las 8 am mediante alimentación oral por sonda. El mismo día a las 1 pm, sacrificar los animales por decapitación para recoger la sangre. Para detalles de la recogida de sangre y tratamientos del plasma, véase secciones más adelante de Recogida de sangre y Extracción de grelina a partir de plasma.

Recogida de sangre

Recoger aproximadamente 600 µl de sangre en un tubo EDTA previamente pesado conteniendo 600 µl (definido como $V_{conservante}$) de conservante recién preparado (PEFABLOC® 4 mM [hidrocloruro de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo], NaCl 72 mM, NaF 58 mM, ácido clorhídrico 0,032 N, pH 3,0) y mezclar inmediatamente. Pesar nuevamente el tubo y mantenerlo sobre hielo. Para determinar con precisión el volumen de sangre exacto de cada muestra usando este procedimiento de recogida de sangre, el peso de la sangre de cada ratón se computó usando la ecuación siguiente:

Peso de la sangre = (Peso del tubo que contiene la sangre + conservante) – (Peso del tubo que contienen el conservante)

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

Nota, la densidad de la sangre de roedores se supone que es de 1,06 g/ml.

Dentro de los 15 minutos después de la recogida de la sangre, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 8 minutos. Separar el plasma (650 µl) a un tubo que vidrio de 5 ml conteniendo ácido clorhídrico 1 N (65 µl), mezclar y mantener sobre hielo.

Extracción de grelina mediante columna SEP-PAK®

Se extrajeron la AG y UAG procedentes del plasma usando una columna SEP-PAK®_C₁₈ para separar interferencias antes de realizar la ELISA. La extracción en fase sólida de los péptidos de AG y UAG mediante columnas SEP-PAK®_C₁₈ puede realizarse sobre un distribuidor de vacío (Waters Corp.) o usando una bomba peristáltica. El procedimiento de extracción mediante la columna SEP-PAK® de la muestra se aplicó de manera independiente a la muestra de plasma obtenida a partir de cada ratón individual. El protocolo de extracción general es tal como se describe a continuación.

Todas las soluciones usadas para el protocolo completo de la extracción mediante la columna SEP-PAK® debe hacerse bajo condición de enfriada en hielo. Mojar las columnas SEP-PAK® (WAT054960, Waters Corp., Milford MA) con ACN al 99,9%/TFA al 0,1% (1 ml de solución de 100 ml de ACN/0,1 ml de TFA). Aplicar presión para ajustar la velocidad de flujo a aproximadamente 1 ml/min para separar el líquido del lecho de la columna, pero no dejar que la columna se seque en ningún punto. Una vez separado el líquido de la columna, parar la presión. Equilibrar las columnas con ACN al 3%/TFA al 1% (1 ml de 97 ml de agua, 3 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Aplicar presión para ajustar la velocidad de flujo a aproximadamente 1 ml/min para separar el líquido del lecho de la columna, pero no dejar que la columna se seque. Diluir aproximadamente 650 µl de plasma acidificado (definido como $V_{\text{plasma agregado a la columna}}$) a 1,4 ml de TFA al 0,1% enfriado en hielo. Cargar todo el plasma acidificado diluido procedente de la etapa previa sobre las columnas. Aplicar presión para ajustar la velocidad de flujo a aproximadamente 0,5 ml/min para permitir que la muestra pase a través de la columna y que los péptidos de grelina se absorban sobre la resina de la columna. No dejar que la columna se seque. Lavar con ACN al 3%/TFA al 0,1% (0,9 ml de 97 ml de agua, 3 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Aplicar presión para ajustar la velocidad de flujo a aproximadamente 1 ml/min para separar el líquido del lecho de la columna, pero no dejar que la columna se seque. Repetir el lavado dos veces más. Eluir con ACN al 60%/TFA al 0,1% (1 ml de 40 ml de agua, 60 ml de ACN, 0,1 ml de TFA). Poner un tubo de recogida debajo de cada columna, aplicar presión para ajustar la velocidad de flujo a aproximadamente 0,5 ml/min, para empujar el líquido a pasar a través de la columna y recoger el eluyente dentro del tubo de recogida. Congelar las muestras sobre hielo seco inmediatamente. Liofilizar las muestras en un acelerador de vacío (Model# SC110A, Savant) y almacenar a -20°C hasta que se realice el ensayo ELISA.

Ensayo ELISA para grelina

Recubrir placas MULTI-ARRAY® MSD® de 96 pocillos (Meso Scale Discovery, Gaithersberg, MD, Catalog #L15XA.3) con 100 µl de 1 µg/ml de un anticuerpo (Patentes WO 2005/026211 y WO 2006/019577) que reconoce el dominio intermedio tanto de las formas acilo como no acilada de la grelina en PBS (Invitrogen). Golpear los lados de la placa para asegurar la cobertura de los pocillos, sellar con adhesivo el cierre de la placa, e incubar durante una noche a temperatura ambiente. Descartar los contenidos y agregar BLOCKER® Casein en PBS (25 µl) (Thermo Scientific, Rockford, IL Catalog #37528) a cada pocillo. Volver a sellar las placas y colocarlas sobre un sacudidor de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

Reconstituir las muestras de plasma preservadas liofilizadas procedentes de la extracción en la columna SEP-PAK®_C₁₈ en BLOCKER® Casein en PBS (400 µl de cada muestra, este volumen se definió como $V_{\text{reconstitución}}$), mezclar

5 bien con un mezclador batidor e incubar sobre hielo durante 45-60 minutos. Descartar los contenidos de las placas y agregar las muestras de plasma reconstituido a 25 µl a cada pocillo. Preparar curvas patrón de acilgrelina y grelina no acilada empezando por 8000 pg/ml y realizando diluciones 1:4 en serie para 8 concentraciones totales. Agregar los patrones preparados por duplicado a las placas bloqueadas con 25 µl en cada pocillo. Sellar las placas e incubarlas a temperatura ambiente sobre un sacudidor de placa durante 2 horas.

10 Descartar los contenidos de la placa y lavarla tres veces con PBS incluyendo TWEEN™ 20 al 0,1% (150 µl) (PBS-T). El anticuerpo específico de acilgrelina (Patente WO 2006/091381) o el anticuerpo de grelina no acilada (Patente WO 2006/055347) marcados con MSD® SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery) se diluyeron a 0,05 µg/ml en 0,2 x BLOCKER Casein conteniendo TWEEN™ 20 al 0,05%, denominada solución de anticuerpo secundaria. Separar el lavado final y agregar solución de anticuerpo secundaria (25 µl a cada pocillo) el cual reconoce específicamente la AG o UAG. Las placas se volvieron a sellar y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un sacudidor de placa antes de lavarlas finalmente 3x nuevamente con PBS-T (150 µl/pocillo).

15 Descartar el lavado final y reemplazar con 1x MSD® Read Buffer (150 µl/pocillo). Leer la señal electroluminiscente generada por la activación del marcador MSD® SULFO-TAG™ unido a los electrodos sobre las placas usando el analizador MSD® SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Calcular las concentraciones de acilgrelina o grelina no acilada en base a las respectivas curvas patrón generadas por el software MSD®. Determinar la concentración de plasma real para cada muestra multiplicando el índice de acilgrelina o de grelina no acilada medido por un factor de dilución. El factor de dilución para cada muestra de plasma se computó mediante la ecuación siguiente.

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

20 Resultados:

25 La administración del compuesto del Ejemplo 2 para 3 días disminuye la AG en plasma AG en 40%, 60%, 56%, 63%, y 63% e incrementa la UAG en 2,10, 2,22, 3,57, 3,49 y 3,78 veces, respectivamente a 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg (resultados tabulados más abajo). La administración a 0,1, 0,3, 1, 3, y 10 mg/kg da como resultado una reducción del 57, 62, 79, 82 y 82% respectivamente en la relación de AG a grelina total, cuando se compara con los animales de control tratados con vehículo.

Tabla 3

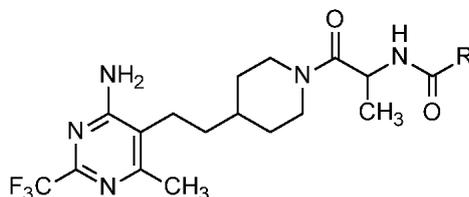
Tratamiento	AG (% de control)	UAG (% de control con vehículo)	AG/grelina total (% de control con vehículo)
Vehículo	100 (n=7)	100 (n=7)	100 (n=7)
0,1 mg/kg	60 ± 8 (n=7)	210 ± 43 (n=7)	43 ± 3 (n=7)
0,3 mg/kg	40 ± 10 (n=7)	222 ± 54 (n=7)	28 ± 1 (n=7)
1 mg/kg	44 ± 6 (n=14)	357 ± 30 (n=14)	21 ± 1 (n=14)
3 mg/kg	37 ± 9,6 (n=14)	349 ± 41 (n=14)	18 ± 5 (n=14)
10 mg/kg	37 ± 9,9 (n=7)	378 ± 59 (n=7)	18 ± 3 (n=7)

Los resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 2 suprime la producción de AG y eleva la UAG en circulación, tal como se muestra en el ratón con GOAT inactivado, *in vivo*.

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula

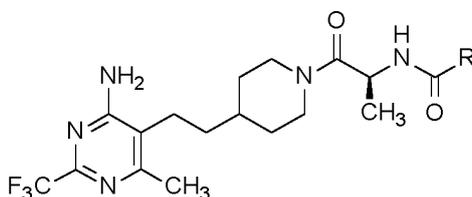


5 en la que R está seleccionado entre alquilo de -C₁-C₃ opcionalmente sustituido con -OH; alquilo de -OC₁-C₄; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

10 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R está seleccionado entre -CH₃ opcionalmente sustituido con -OH; -OCH₃ o -OC(CH₃)₃; pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo, piridacinilo, o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

15 3. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R está seleccionado entre pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, o tiadiazolilo, en el que pirazolilo, oxazolilo, o tiazolilo cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido una o dos veces con -CH₃; piridinilo o piracinilo, en el que cada uno de ellos puede estar opcionalmente sustituido con -Cl; y fenilo opcionalmente sustituido con -OCH₃; o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

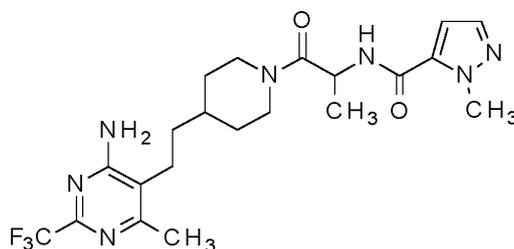
4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la configuración del átomo de carbono con el sustituyente metilo es (S):



20

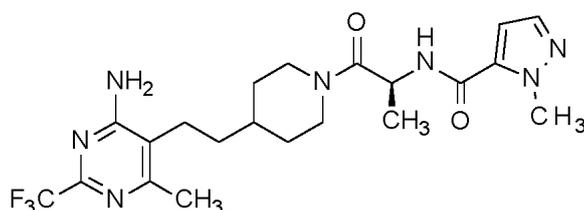
o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de fórmula



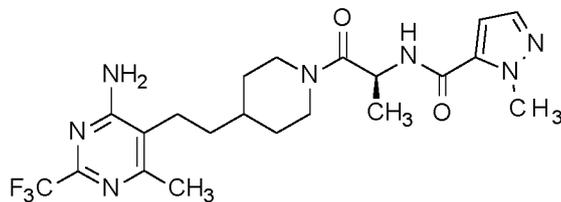
o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

25 6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 de fórmula



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 de fórmula



- 5 **8.** Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente.
- 9.** La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en combinación con uno o más agentes terapéuticos.
- 10.** Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en terapia.
- 10 **11.** Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en reducción de la ganancia de peso.
- 12.** Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en reducción de la recuperación de peso.
- 15 **13.** Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento de la obesidad.
- 14.** Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.