

COMPUESTOS DE 2,6-DIAMINOPIRIDINA

La presente invención se refiere a compuestos inhibidores de la cetohecoxinasa (KHK) novedosos, a composiciones farmacéuticas que comprenden
5 estos compuestos y al uso de los compuestos para el tratamiento de determinadas afecciones metabólicas, tales como la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), la insuficiencia cardíaca, la nefropatía diabética y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

El síndrome metabólico se define comúnmente como un conjunto de
10 afecciones que reflejan la nutrición y un estilo de vida sedentario, y sus manifestaciones incluyen la T2DM, la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), la obesidad, la dislipidemia, la insuficiencia cardíaca y las enfermedades renales.

La T2DM se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina causada por la disfunción de las células β pancreáticas y la resistencia a la insulina en los
15 órganos diana. Esta abarca a más del 90 % de los pacientes con diabetes y conduce a complicaciones microvasculares y macrovasculares que causan un profundo sufrimiento psicológico y físico a los pacientes al tiempo que representa una gran carga para los sistemas de atención médica (Davies, M.J., *et al.*; *Lancet*, 389, 2239-2251, 2017).

20 La insuficiencia cardíaca es un síndrome causado por anomalías cardíacas estructurales o funcionales que conducen a presiones intracardíacas elevadas o un gasto cardíaco reducido en reposo o durante el estrés. La insuficiencia cardíaca es una causa prominente y en aumento de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Teerlink, J.R., *et al.*; *Lancet*, 390, 1981-1995, 2017).

25 La enfermedad renal diabética se desarrolla en casi la mitad de los pacientes con T2DM y es la principal causa de enfermedades renales crónicas en todo el mundo. Los cambios metabólicos asociados con la diabetes conducen a la hiperfiltración glomerular, la albuminuria progresiva, la disminución de la tasa de

filtración glomerular y, finalmente, la enfermedad renal en etapa terminal (Alicic, R.Z., *et al.*; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 2032-2045, 2017).

La NAFLD representa un espectro de enfermedades hepáticas que puede conducir a la NASH progresiva, la fibrosis y, en última instancia, al carcinoma hepatocelular y la insuficiencia hepática. Se estima que, en los próximos 20 años, la NAFLD se convertirá en la principal causa de morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado, así como en la principal indicación para el trasplante de hígado (Bertot, L.C., *et al.*; *Int. J. Mol. Sci.*, 17(5), 774, 2016).

La KHK, también conocida como fructoquinasa, es la enzima limitante de la velocidad involucrada en el metabolismo de la fructosa. Esta cataliza la fosforilación de la fructosa a fructosa-1-fosfato (F1P), lo que causa el agotamiento concomitante de los niveles celulares de ATP. En contraste con la glucosa, el metabolismo de la fructosa carece de retroinhibición y desencadena la acumulación de intermedios de fase posterior involucrados en, por ejemplo, la lipogénesis, la gluconeogénesis y la fosforilación oxidativa (Hannou, S.A., *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 128(2), 544-555, 2018). Esto tiene consecuencias metabólicas negativas que están asociadas con varios trastornos metabólicos graves.

La KHK existe en dos isoformas empalmadas alternativamente que consisten en KHK-C y KHK-A y difieren en el exón 3. La KHK-C se expresa principalmente en el hígado, el riñón y el intestino, mientras que la KHK-A es más ubicua. Los ratones deficientes en ambas isoformas están totalmente protegidos del síndrome metabólico inducido por fructosa. Sin embargo, los efectos metabólicos adversos se exacerban en los ratones que carecen de KHK-A solamente (Ishimoto T, *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(11), 4320-4325, 2012).

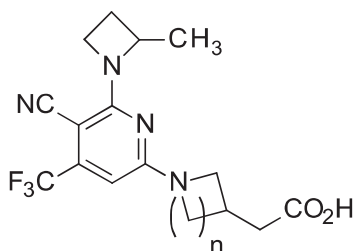
Varios estudios epidemiológicos y experimentales han informado que un mayor consumo de fructosa y, más precisamente, un aumento del metabolismo de la fructosa, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del síndrome metabólico, en particular en el desarrollo de la T2DM (Softic *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 127(11), 4059-4074, 2017), la insuficiencia cardíaca (Mirtschink, P., *et al.*; *Eur.*

Heart J., 39, 2497-2505, 2018), la enfermedad renal diabética (Cirillo, P., *et al.*; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20, 545-553, 2009) y la NAFLD/NASH (Vos, M.B., *et al.*; *Hepatology*, 57, 2525-2531, 2013). Se espera que la inhibición selectiva de la KHK limite el metabolismo de la fructosa y proporcione opciones de tratamiento eficaces para varios trastornos metabólicos.

El documento US 2017/0183328 A1 describe 3-azabicyclo[3.1.0]hexanos sustituidos como inhibidores de la KHK.

Existe la necesidad de tratamientos alternativos para el síndrome metabólico y las indicaciones asociadas que incluyen la T2DM, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad renal diabética y la NASH. En particular, existe la necesidad de compuestos que tengan actividad inhibidora de KHK para proporcionar opciones de tratamiento para estas enfermedades. Existe además la necesidad de potentes inhibidores de KHK que tengan propiedades que sean importantes para el uso terapéutico en seres humanos, tales como la biodisponibilidad oral y una semivida suficiente para soportar la dosificación diaria, o un perfil limitado de interacción fármaco-fármaco.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



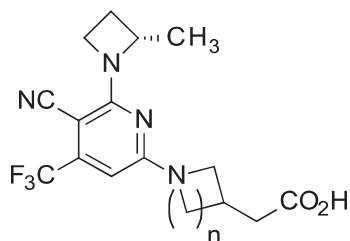
Fórmula I

en donde n es 1 o 2;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

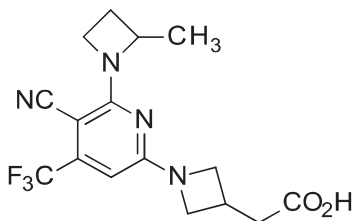
La Fórmula I incluye todos los diastereómeros y enantiómeros individuales de este, así como mezclas de enantiómeros y racematos.

En una modalidad particular, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:

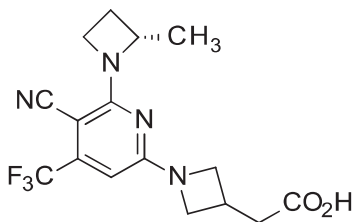


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 En una modalidad, n es 1. En esta modalidad, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



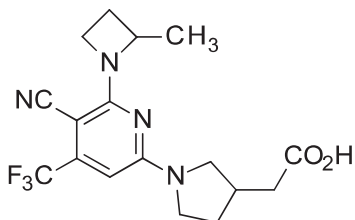
o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, un compuesto de la invención es un compuesto la fórmula:



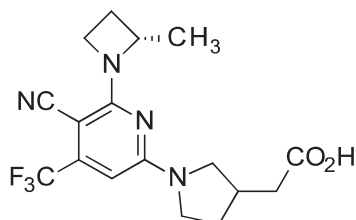
10

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

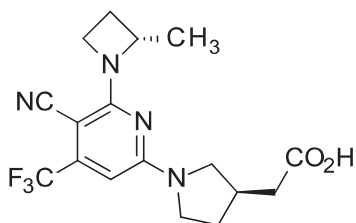
En otra modalidad, n es 2. En esta modalidad, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida adicional, un compuesto de la invención es un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En esta modalidad, el compuesto de la invención es ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidín-3-il]acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para tratar la T2DM en un paciente que necesita tal tratamiento que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidín-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-

metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para tratar la enfermedad renal diabética en un paciente que necesita tal
 5 tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para tratar la NASH en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-
 15 (trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para tratar la enfermedad renal crónica en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de
 20 Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una modalidad, la presente invención proporciona además un método de
 25 tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en el síndrome metabólico, la NAFLD, la obesidad, las complicaciones diabéticas, por ejemplo, la retinopatía diabética, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades de la arteria coronaria y la dislipidemia, en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de

Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad preferida, el método comprende administrar ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 Además, en una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia. En una modalidad particular, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la T2DM. En una modalidad particular, la presente invención
- 10 proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En una modalidad particular, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética. En una modalidad particular, la presente invención
- 15 proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la NASH. En una modalidad particular, la presente invención también proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal crónica. En una modalidad, la invención también proporciona un
- 20 compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico, la NAFLD, la obesidad, las complicaciones diabéticas, por ejemplo, la retinopatía diabética, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades de la arteria coronaria, o la dislipidemia. En una modalidad preferida, el compuesto de Fórmula I para los usos terapéuticos
- 25 mencionados anteriormente es ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Además, en una modalidad, esta invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la

fabricación de un medicamento para tratar la T2DM. En una modalidad, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para tratar la insuficiencia cardíaca. En una modalidad, la presente invención proporciona

5 el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad renal diabética. En una modalidad, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para tratar la NASH. En una modalidad, la presente
10 invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad renal crónica. En una modalidad, la invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para tratar el síndrome
15 metabólico, la NAFLD, la obesidad, las complicaciones diabéticas, por ejemplo, la retinopatía diabética, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades de la arteria coronaria, o la dislipidemia. En una modalidad preferida, el compuesto de Fórmula I es ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridilo]pirrolidin-3-il]acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 En una modalidad, la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad, la invención proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica que
25 comprende mezclar un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Como se usa en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" incluyen restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un mamífero.

- 5 Preferiblemente, el paciente es humano.

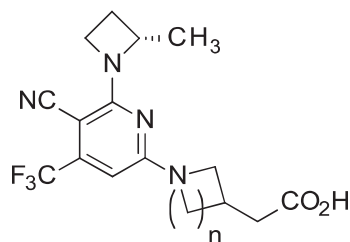
Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que, tras la administración al paciente de la dosis única o múltiple, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o
10 tratamiento.

El experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente se considera una serie de factores que incluyen, de modo no taxativo: la especie del
15 paciente; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado o la participación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto específico que se administra; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación que se administra; el régimen de dosis seleccionado; el uso de
20 medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes. Los compuestos de la presente invención son eficaces a una dosis diaria ubicada dentro del intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal.

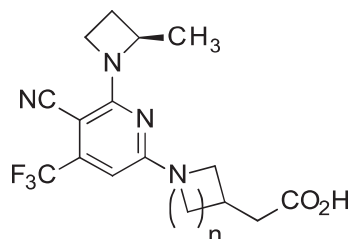
Los compuestos de la presente invención se formulan como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto sea
25 biodisponible. Preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y los procesos para prepararlas son ampliamente conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington, J. P., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Los compuestos de Fórmula I y las sales farmacéuticamente aceptables de estos son particularmente útiles en los métodos de tratamiento de la invención, aunque se prefieren determinadas configuraciones. En la siguiente lista de compuestos de la presente invención se describen tales configuraciones. Debe entenderse que estas preferencias son aplicables a los compuestos de la invención, así como a los métodos de tratamiento, los usos terapéuticos y las composiciones farmacéuticas.

Los compuestos de la presente invención incluyen:



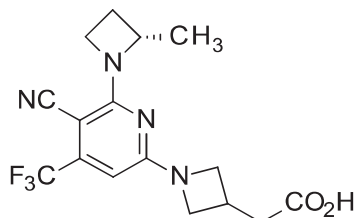
Fórmula Ia



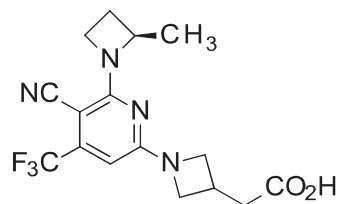
Fórmula Ib

y las sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Otros compuestos de la presente invención incluyen:



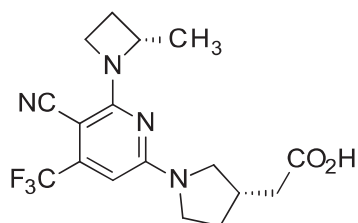
Fórmula IIa



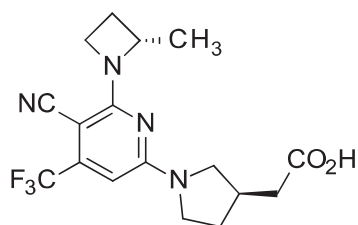
Fórmula IIb

y las sales farmacéuticamente aceptables de estos.

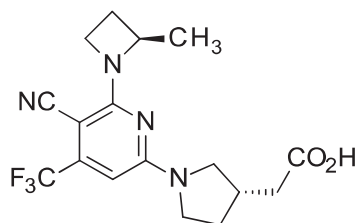
Otros compuestos de la presente invención incluyen:



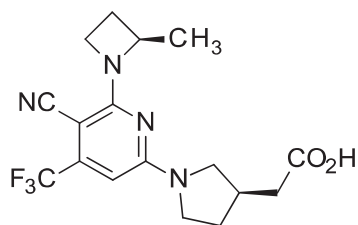
Fórmula IIIa'



Fórmula IIIa''



Fórmula IIIb'



Fórmula IIIb''

y las sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diasterómeros individuales, así como las mezclas de estos, incluidos los racematos, se prefieren particularmente los compuestos de Fórmula Ia, Fórmula IIa y IIIa'', y las sales farmacéuticamente de estos.

El experto en la técnica puede separar o resolver los enantiómeros individuales, en cualquier momento conveniente de la síntesis de los compuestos de la invención, mediante métodos tales como las técnicas de cristalización selectiva, la cromatografía quiral (ver, por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994), o la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (ver, por ejemplo, T. A. Berger; "*Supercritical Fluid Chromatography Primer*", Agilent Technologies, julio de 2015).

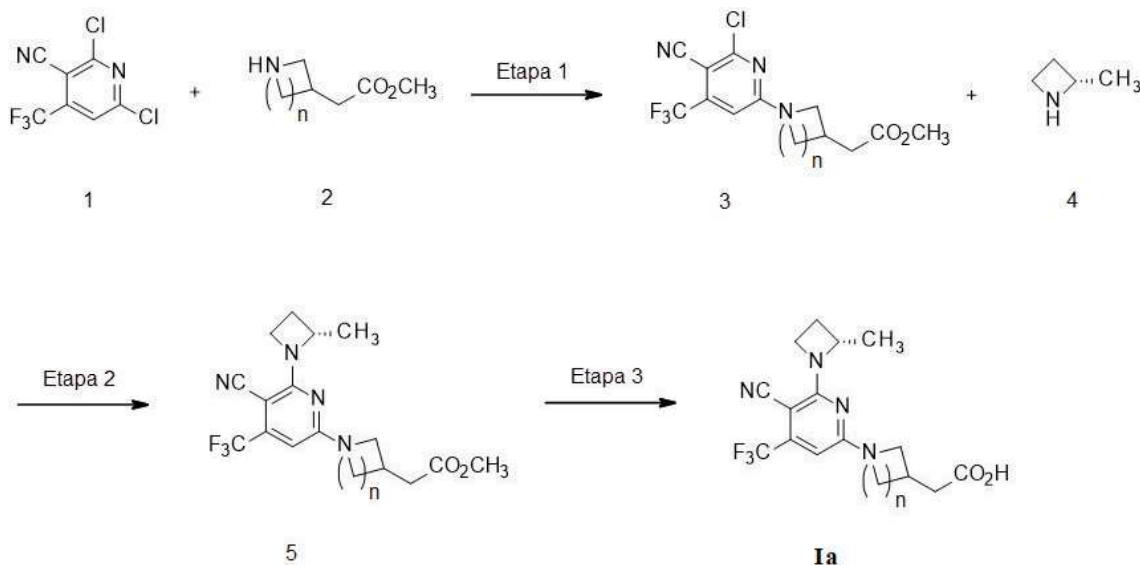
Se puede formar una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención, por ejemplo, mediante la reacción de una forma neutra apropiada de un compuesto de la invención y un ácido o base farmacéuticamente aceptable apropiado en un disolvente adecuado en condiciones estándar ampliamente conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Bastin, R.J., *et al.*; *Org. Process. Res. Dev.*, 4, 427-435, 2000, y Berge, S.M., *et al.*; *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977).

Los compuestos de la presente invención, o las sales de estos, se pueden preparar mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, las preparaciones y los ejemplos a continuación. Los productos de cada etapa de los esquemas a continuación se pueden recuperar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, que incluyen la extracción, la evaporación, la precipitación, la cromatografía, la filtración, la trituración y la cristalización. En los esquemas a continuación, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son los definidos previamente. Los expertos en la técnica pueden acceder con facilidad a

los reactivos y materiales de partida. Sin limitar el alcance de la invención, se proporcionan los siguientes esquemas, preparaciones y ejemplos para ilustrar adicionalmente la invención. Además, un experto en la técnica apreciará que los compuestos de Fórmula I se pueden preparar mediante el uso de un intermedio o material de partida con la correspondiente configuración estereoquímica deseada que puede ser preparada por un experto en la técnica.

Determinadas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ABT" se refiere a 1-aminobenzotriazol; "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a la albúmina de suero bovino; "CAS#" se refiere al número de registro de Chemical Abstracts; "DCM" se refiere a cloruro de metileno o diclorometano; "DIPEA" se refiere a diisopropiletilamina; "DMEM" se refiere al medio de Eagle modificado de Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "ELSD" se refiere al detector de dispersión de luz por evaporación; "ES/MS" se refiere a la espectrometría de masas por electropulverización; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol o alcohol etílico; "FBS" se refiere al suero bovino fetal; "h" se refiere a hora u horas; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "Me" se refiere a metilo; "MeOH" se refiere a metanol; "MTBE" se refiere a metil-*terc*-butil éter; "min" se refiere a minutos o minutos; "m/z" se refiere a la relación masa-carga; "PBS" se refiere a solución salina amortiguada con fosfato; "Ph" se refiere a fenilo; "RBF" se refiere a matraz de destilación; "RT" se refiere a la temperatura ambiente; "SCX" se refiere al intercambio selectivo de cationes; "SFC" se refiere a la cromatografía de fluidos supercríticos; "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

Esquema 1



El esquema 1 representa la preparación general de los compuestos de Fórmula I. En la etapa 1, se hacen reaccionar 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (1) y una amina cíclica (2) en presencia de un base, tal como NaHCO_3 o DIPEA, en EtOH o MeOH para producir una aminopiridina (3). De forma alternativa, el disolvente de reacción para esta etapa puede ser DCM. En la etapa 2, el compuesto 3 se hace reaccionar con 2-metil azetidina (4) a temperatura elevada y en presencia de una base, tal como NaHCO_3 o DIPEA, en EtOH o MeOH para producir una diaminopiridina (5). De forma alternativa, el disolvente de reacción para esta etapa puede ser THF. En la etapa 3, el resto de éster se hidroliza mediante el uso de una base tal como NaOH o LiOH en MeOH o THF a temperatura elevada para producir un compuesto de Fórmula Ia. De forma alternativa, esta etapa se puede realizar mediante el uso de los mismos reactivos en un reactor de microondas.

15

Preparaciones y ejemplos

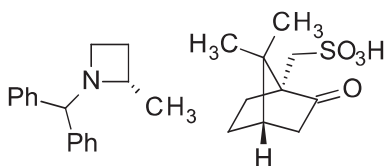
Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica del compuesto de la invención. Los expertos en la técnica pueden sintetizar o acceder con facilidad a los reactivos y materiales de

partida. Debe entenderse que las preparaciones y los ejemplos se exponen a modo de ilustración y no de limitación, y que un experto en la técnica puede realizar diversas modificaciones.

- La LC-ES/MS se realiza en un sistema de cromatografía de líquidos
- 5 AGILENT® HP1100. Las mediciones de espectrometría de masas por electropulverización (adquiridas en modo positivo y/o negativo) se realizan en un espectrómetro de masas de cuadrupolo de detección selectiva de masas interconectado a una HPLC que puede tener o no un ELSD. Condiciones de LC-MS (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2.0 x 50 mm 3.0 µm, 110 Å;
- 10 gradiente: 5-95 % de B en 1.5 min, luego 95 % de B durante 0.5 min, temperatura de columna: 50 °C +/- 10 °C; velocidad de flujo: 1.2 ml/min; volumen de inyección 1 µl; Disolvente A: agua desionizada con HCOOH al 0.1 %; Disolvente B: ACN con ácido fórmico al 0.1 %; longitud de onda 200-400 nm y 212-216 nm. Si la HPLC está equipada con un ELSD, se ajusta la temperatura del evaporador a 45 °C, la
- 15 temperatura del nebulizador a 40 °C y la velocidad de flujo de gas a 1.6 SLM. Condiciones de LC-MS alternativas (pH alto): columna: columna Waters xBridge® C18 2.1 x 50 mm, 3.5 µm; gradiente: 5-95 % de B en 1.5 min, luego 95 % de B durante 0.50 min; temperatura de columna: 50 °C +/- 10 °C; velocidad de flujo: 1.2 ml/min; volumen de inyección de 1 µl; Disolvente A: NH₄HCO₃ 10 mM pH 9;
- 20 Disolvente B: ACN; longitud de onda: 200-400 nm y 212-216 nm; si tuviera ELSD: temperatura del evaporador a 45 °C, temperatura del nebulizador a 40 °C y velocidad de flujo de gas a 1.60 SLM.

Preparación 1

- 25 Sal de ácido (2S)-1-benzhidril-2-metil-azetidina [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfónico

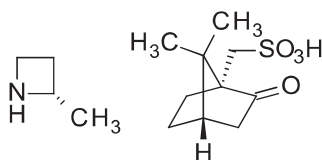


Disponer un matraz de destilación de 3 bocas de 2000 ml con un embudo de adición, una entrada de nitrógeno y un adaptador para termómetro. Purgar el recipiente con nitrógeno y añadir (3R)-butano-1,3-diol (25 g, 277.4 mmol), DIPEA (127 ml, 731 mmol) y ACN (556 ml). Enfriar hasta -30 °C. Añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (101 ml, 601 mmol) gota a gota durante 3 h, de modo que la temperatura interna se mantenga entre -35 y -30 °C. Después de completar la adición, agitar durante 10 minutos a una temperatura de -35 a -30 °C. Añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (1.9 ml, 11 mmol) gota a gota durante 5 minutos, de modo que la temperatura interna se mantenga entre -35 y -30 °C. Después de completar la adición, agitar durante 10 minutos a una temperatura de -35 a -30 °C. Añadir DIPEA (127 ml, 731 mmol) gota a gota durante 15 minutos, de modo que la temperatura interna se mantenga entre -35 y -30 °C. Después de completar la adición, agitar durante 10 minutos de -35 a -30 °C. En un matraz separado bajo nitrógeno, disolver el aminodifenilmetano (48.0 ml, 270 mmol) en ACN (49 ml, 935 mmol) y transferir la solución resultante al embudo de adición. Añadir la solución de amina al triflato frío gota a gota durante 40 minutos, de manera que la temperatura interna se mantenga entre -20 y -35 °C. Después de completar la adición, agitar durante 30 min de -35 a -30 °C. Transferir la reacción a un baño de agua y dejar que se caliente lentamente durante 30 minutos. Retirar el baño y dejar que la reacción se caliente hasta temperatura ambiente durante 30 min. Transferir el recipiente a una manta calefactora y calentar la reacción hasta 45 °C durante 30 minutos, luego enfriar hasta temperatura ambiente. Verter la mezcla resultante en 1200 ml de agua y extraer con tolueno (400 ml x 3). Combinar los extractos, lavar con agua, solución de NaCl sat. ac., secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar en un evaporador rotativo. Secar el material al vacío durante la noche. Disolver el residuo en DCM (400 ml). Preparar una almohadilla de sílice en un embudo vitrificado y dejar equilibrar con heptano/EtOAc 1:1. Cargar la solución del producto en la almohadilla de sílice y lavar con 1600 ml de heptano/EtOAc 1:1. Concentrar el filtrado para obtener un aceite rojo. Disolver el aceite en MeOH (250 ml) y colocar el

- matraz en un baño de agua ($\sim 10^\circ\text{C}$). Añadir ácido L(-)-canforsulfónico (61.6 g, 265 mmol) en partes manteniendo la temperatura interna por debajo de 20°C . Agitar la mezcla resultante durante 15 minutos y luego concentrar en un evaporador rotativo para obtener una espuma marrón. Secar la espuma en una bomba de vacío durante
- 5 2 h. Disolver la espuma en 130 ml de DCM. Conectar un embudo de adición al matraz. Usar el embudo para añadir lentamente 1100 ml de EtOAc a la solución en agitación. Transferir la mezcla resultante a un vaso de precipitados de 4000 ml y agitar a abierto a la atmósfera durante la noche. Enfriar el vaso de precipitados en un baño de hielo durante 10 min. Recoger el precipitado en un embudo vitrificado
- 10 mediante lavado por filtración al vacío con una cantidad mínima de EtOAc helado. Secar el sólido sobre la frita durante 2 h. Disolver el sólido blanco resultante en una cantidad mínima de DCM, transferir a un vaso de precipitados de 2000 ml y luego diluir lentamente con EtOAc hasta que la solución transparente comience a volverse turbia. Agitar la suspensión durante 4 h abierta a la atmósfera. Recoger los sólidos
- 15 por filtración al vacío con un embudo vitrificado y secar sobre la frita durante la noche para obtener el compuesto del título (111.8 g, 238.06 mmol, 86 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 10.54-10.47 (m, 1H), 7.61 (d, $J = 7.3$ Hz, 5H), 7.47-7.37 (m, 7H), 5.85 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.68-4.61 (m, 1H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.37 (s, 8H), 2.99 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 2.77-2.68 (m,
- 20 1H), 2.51-2.44 (m, 4H), 2.30-2.16 (m, 2H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.42-1.28 (m, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.01 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.77 (s, 4H); $>98\%$ ee [HPLC: Chiralcel OJ (10 cm x 4.6 mm, $5\ \mu\text{m}$), 5 ml/min, EtOH 10 % isocrático 40°C (0.2 % $i\text{PrNH}_2$)/ CO_2].

Preparación 2

- 25 Sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato(2S)-2-metilazetidin-1-ilo

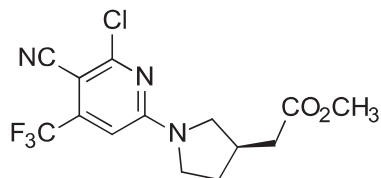


A un recipiente Parr de 2250 ml, añadir 20 % en peso de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ en carbono (6.62 g). Purgar la botella con nitrógeno y añadir 250 ml de MeOH. A la suspensión resultante, añadir lentamente la sal de ácido (2S)-1-benzhidril-2-metil-azetidina[(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfónico (111 g, 236 mmol) disuelta en 250 ml de MeOH. Sellar el recipiente. Purgar con nitrógeno seguido de hidrógeno y presurizar a 60 PSI. Agitar vigorosamente el recipiente de reacción en un aparato Parr Shaker durante 15 h a temperatura ambiente. Purgar el recipiente con nitrógeno y luego filtrar la mezcla de reacción a través de una capa de celite, al tiempo que se lava con MeOH. Concentrar el filtrado para obtener un sólido blanco y secar al vacío. Suspender el sólido en 780 ml de MTBE/EtOAc 1:1 y calentar la mezcla hasta 65 °C durante 20 h, y luego enfriar hasta temperatura ambiente y agitar durante la noche. Recoger los sólidos por filtración. Suspender los sólidos en 380 ml de MTBE y agitar a temperatura ambiente durante 24 h. Recoger el sólido blanco por filtración para obtener el compuesto del título (41.5 g, 136.78 mmol, 58 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 8.68-8.55 (m, 1H), 4.51-4.42 (m, 1H), 3.91-3.75 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.91 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 2.69-2.61 (m, 1H), 2.52-2.46 (m, 2H), 2.28-2.22 (m, 1H), 2.17-2.10 (m, 1H), 1.96 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 1.89-1.79 (m, 1H), 1.43 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 1.36-1.26 (m, 1H), 1.05 (s, 2H), 0.75 (s, 2H).

20

Preparación 3

2-[(3R)-1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidin-3-il]acetato de metilo



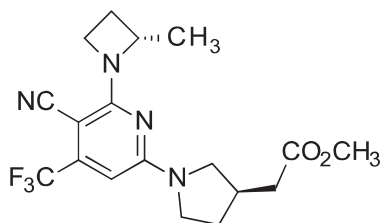
Añadir 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (123 mmol, 29,6 g) y EtOH (230 ml) a un matraz de destilación. Enfriar la mezcla hasta 0 °C. Añadir NaHCO_3 (368 mmol, 31 g) seguido de una solución de hidrocloreuro (R)pirrolidina-3-acetato de

25

metilo (23 g, 123 mmol) en EtOH (230 ml). Dejar que la mezcla resultante se caliente hasta temperatura ambiente durante la noche. Evaporar la mezcla de reacción hasta que se seque en un evaporador rotativo. Añadir agua (200 ml) y extraer con MTBE (2 x 200 ml). Combinar los extractos y evaporar hasta que se seque. Purificar por cromatografía en gel de sílice con hexano/MTBE (gradiente de 20 a 70 %) para obtener el compuesto del título (34.7 g, 99.89 mmol, 81 % de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 348.0, 350.0 [M+H]⁺.

Preparación 4

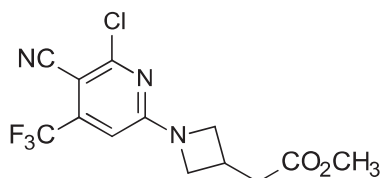
- 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidin-3-il]acetato de metilo



- Agregar a un matraz de destilación 2-[(3R)-1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidin-3-il]acetato de metilo (25.5 g, 73.3 mmol), sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidin-1-io (88.0 mmol, 26.7 g), MeOH (255 ml) y NaHCO₃ (220 mmol, 18.5 g). Agitar la mezcla a 65 °C durante 16 h. Añadir sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidin-1-io (22.0 mmol, 6.68 g) y NaHCO₃ (147 mmol, 12.3 g) y continuar agitando durante 32 h. Eliminar el disolvente en un evaporador rotativo. Añadir agua (300 ml) al residuo y extraer con MTBE (2 x 200 ml). Combinar los extractos y secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar a través de gel de sílice y concentrar hasta que se seque para obtener el compuesto del título (28.0 g, 73.2 mmol, 99 % de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 383.2 [M+H]⁺.

Preparación 5

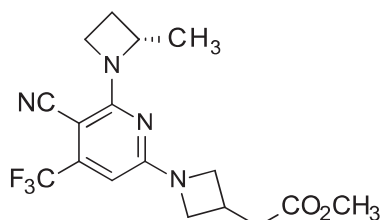
2-[1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidin-3-il]acetato de metilo



A una solución de 3-ciano-2,6-dicloro-4-(trifluorometil)piridina (500 mg, 2.03 mmol) en EtOH (15 ml) añadir NaHCO₃ (0.549 g, 6.51 mmol) y sal de ácido trifluoroacético 2-(azetidin-3-il)acetato de metilo (0.494 g, 2.03 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h. Diluir la mezcla de reacción con solución de NaCl sat. ac. (30 ml). Extraer con EtOAc (20 ml x 3). Combinar los extractos y lavar con solución de NaCl (30 ml) sat. ac., secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc en éter de petróleo (gradiente 0-30 %) para obtener el compuesto del título (470 mg, 1.41 mmol, 66 % de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z) = 333.9 [M+H]⁺.

Preparación 6

2-[1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidin-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidin-3-il]acetato de metilo



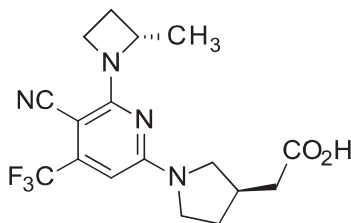
A una solución de 2-[1-[6-cloro-5-ciano-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidin-3-il]acetato de metilo (200 mg, 0.569 mmol) en EtOH (6 ml) añadir NaHCO₃ (0.173 g, 2.05 mmol) y sal de [(1R,4S)-7,7-dimetil-2-oxo-norbornan-1-il]metanosulfonato (2S)-2-metilazetidin-1-ilo (0.194 g, 0.626 mmol). Calentar la mezcla hasta 80 °C durante 16 h. Diluir con agua (50 ml) y extraer con EtOAc (40 ml x 3). Combinar los extractos y lavar con solución de NaCl sat. ac. (50 ml), secar sobre un filtro de

Na₂SO₄ anhidro y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0 % - 10 %, EtOAc en éter de petróleo) para obtener el compuesto del título (176 mg, 0.46 mmol, 77 % de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 383.1 [M+H]⁺.

5

Ejemplo 1

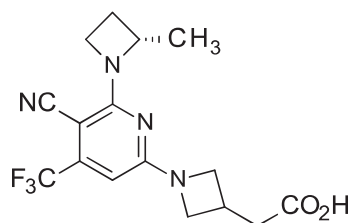
Ácido 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acético



- 10 A un matraz de destilación, añadir 2-[(3R)-1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]pirrolidín-3-il]acetato de metilo (26.5 g, 69.3 mmol), MeOH (265 ml), y solución de NaOH 2M ac. (416 mmol, 208 ml). Agitar la mezcla a 60 °C durante 3 h. Enfriar hasta temperatura ambiente y extraer el MeOH en un evaporador rotativo. Acidificar la fase acuosa hasta pH 3-4 con una solución acuosa
- 15 concentrada de HCl. Extraer con EtOAc (400 ml). Lavar la capa orgánica con agua (200 ml), secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar hasta que se seque para obtener el compuesto del título (22.5 g, 61.11 mmol, 88 % de rendimiento) como una espuma blanca. ES/MS (m/z): 369.2 [M+H]⁺.

20 Ejemplo 2

Ácido 2-[1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidín-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidín-3-il]acético



A una mezcla de 2-[1-[5-ciano-6-[(2S)-2-metilazetidino-1-il]-4-(trifluorometil)-2-piridil]azetidino-3-il]acetato de metilo (176 mg, 0.478 mmol) en THF (5.00 ml) y agua (1.00 ml) añadir LiOH (0.04 g, 0.955 mmol). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 h. Diluir con EtOAc (4 ml) y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 ml x 3). Combinar los extractos orgánicos y lavar con solución de NaCl sat. ac. (3 ml x 2), secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar, concentrar para proporcionar el compuesto del título (128 mg, 0.36 mmol, 78 % de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS (m/z) 354.9 [M+H]⁺.

Ensayos

Ensayo de la actividad enzimática de KHK para KHK-C humana y KHK-A humana

La potencia intrínseca de los compuestos se puede medir mediante el uso de un ensayo enzimático que mide la producción de F1P. Los compuestos se preparan en DMSO y se prueban en una curva de concentración de 10 puntos para crear diluciones en serie triple de los compuestos en una placa de 96 pocillos que varía de 20 µM a 1.02 nM. La enzima se prepara en el amortiguador de ensayo [ácido de 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 50 mM, cloruro de potasio 10 mM, cloruro de magnesio 100 mM, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 2 mM, 0.01 % de glucósido de n-octilo] e incubado con compuestos a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se lleva a cabo en volúmenes de 100 µl que contienen concentraciones de sustrato de fructosa (250 µM para el ensayo KHK-C y 1.25 mM para el ensayo KHK-A) y ATP (150 µM para ambas isoformas); que se incuban adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 min. Luego la reacción se detiene mediante la adición de amortiguador de parada; que consiste en 0.2 % de

ácido fórmico y 1 µg/ml de estándar interno $^{13}\text{C}_6$ -fructosa-6-fosfato ($^{13}\text{C}_6$ -F6P). Las placas se almacenan a -20 °C hasta el análisis RapidFire MS.

Análisis RapidFire MS para la cuantificación de F1P:

Un sistema de extracción automático Agilent 300 RapidFire (Agilent, Santa Clara, CA) con tres bombas cuaternarias de HPLC se acopla a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6495 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con una fuente de interfaz de ionización por electropulverización (ESI). El sistema de espectrometría de masas RapidFire está equipado con un cartucho reutilizable de extracción en fase sólida (SPE) RapidFire C18 (tipo C) (G9205A).

El disolvente A, utilizado para la carga y el lavado de la muestra, es octilamina 6 mM (Acros Organics 129495000) que se lleva a pH 5.0 con ácido acético. El disolvente B, utilizado para la elución de la muestra, es 20 % de agua en ACN que contiene 0.1 % de ácido fórmico. Las muestras se analizan secuencialmente aspirando 10 µL en el bucle de recolección al vacío directamente de placas de múltiples pocillos. Los 10 µl de muestra se cargan en el cartucho C18 y se lavan con el disolvente A a una velocidad de flujo de 1.25 ml/min durante 5000 ms. Los analitos retenidos se eluyen luego al espectrómetro de masas con el disolvente B a una velocidad de flujo de 1.25 ml/min durante 5000 ms. El sistema se reequilibra con el disolvente A a una velocidad de flujo de 1.25 ml/min durante 2000 ms.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo está equipado con una fuente de ESI y los analitos se monitorean mediante el uso del monitoreo de reacción seleccionado (SRM) en modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$. La F1P se monitorea a m/z 259.02/96.9 y el $^{13}\text{C}_6$ -fructosa-6-fosfato se monitorea a m/z 264.99/97. Los valores de relación de área para la F1P se calculan mediante el uso de $^{13}\text{C}_6$ -fructosa-6-fosfato como estándar interno.

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 se probaron esencialmente como se describe anteriormente:

Tabla 1

Número de ejemplo	hKHK-C IC ₅₀ (nM)	hKHK-A IC ₅₀ (nM)
1	9	19
2	27	37

Estos resultados demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 inhiben la actividad enzimática tanto de KHK-C como de KHK-A.

5

Ensayo de la actividad celular de KHK

La potencia se puede medir mediante un ensayo celular para la inhibición de la conversión de fructosa a F1P por KHK celular. Las células HepG2 se colocan en placas de cultivo celular de 96 pocillos en medio de cultivo [medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa, suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (HI FBS), 1 x penicilina/estreptomicina] y se dejan unir durante la noche en una incubadora a 37 °C. Los medios de cultivo se lavan y se reemplazan con medios de ensayo que consisten en el medio de suero reducido Gibco OptiMEM 1, 0.1 % de caseína, D-fructosa-¹³C₆ 8.33 mM y concentraciones de compuestos que varían de 100 µM a 0.0051 µM (curva de concentración de 10 puntos). Las placas se incuban a 37 °C durante 3 h, después de lo cual se aspiran los medios de ensayo de los pocillos celulares. A continuación se añade a las células la solución de parada que consiste en 80 % de metanol, acetato de amonio 2 mM y 50 ng/ml de fructosa-6-fosfato-¹³C₆. Las placas se almacenan a -20 °C hasta el análisis RapidFire MS (descrito anteriormente).

20

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 se probaron esencialmente como se describe anteriormente:

Tabla 2

Número de ejemplo	HepG2 IC ₅₀
1	127
2	316

Estos resultados demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 inhiben el metabolismo de la fructosa a F1P.

5

Método de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para ensayos farmacocinéticos: las muestras se extraen mediante el uso de una precipitación de proteínas añadiendo 180 µl de MeOH:ACN (1:1, v/v) que contiene un estándar interno y 25 µl (muestras de roedores) o 50 µl (muestras sin roedores) de plasma. Las muestras luego se diluyen con MeOH:agua (1:1, v/v) para obtener concentraciones dentro del intervalo de curva estándar. Las muestras diluidas se analizan por LC-MS/MS mediante el uso de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000 (Applied Biosystems/MDS; Foster City, CA) equipado con una interfaz TurbolonSpray, y operado en modo de ión positivo. Los analitos se separan de forma cromatográfica con una columna de Javelina Thermo Betasil C18 5µm 20X2.1 mm (muestras de roedores) o una columna Advantage ECHIELON C18 4µm 20 mm x 2.1 mm ID (muestras sin roedores). Las condiciones de LC son agua/bicarbonato de amonio 1M, (2000:10, v/v) (fase móvil A) y MeOH/bicarbonato de amonio 1M, (2000:10, v/v) (fase móvil B).

20

Farmacocinética en ratones

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* y la participación del transportador OATP1A/1B en la disposición del Ejemplo 1 se demuestran mediante el uso de ratones de tipo salvaje FVB y ratones knockout OATP1A/1B (Taconic n.º 10707) (en ayunas; n=4/genotipo). El Ejemplo 1 es administrado mediante una dosis única intravenosa (IV; 1 mg/kg; volumen de 1 ml/kg) en el vehículo. Se extrae sangre de

25

cada animal a las 0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h después de la dosificación. El hígado, el bazo y el páncreas se extraen, se pesan y se perfusionan a las 24 h después de la dosificación. Las concentraciones en plasma y tejido del Ejemplo 1 se determinan mediante un método de LC-MS/MS tal como se describe anteriormente.

- 5 En ratones FVB, el Ejemplo 1 tiene una semivida de 5.43 horas, un aclaramiento promedio de 6.91 ml/hr/kg, un volumen de distribución de 2.74 l/kg, con un coeficiente de reparto libre promedio del hígado (K_{puu}) de 67.5. En ratones knockout OATP1A/1B, el Ejemplo 1 tiene una semivida de 9.36 horas, un aclaramiento promedio de 1.34 ml/hr/kg, un volumen de distribución de 0.986 L/kg,
- 10 con un coeficiente de reparto libre promedio del hígado (K_{puu}) de 24.2. Estos datos muestran que OATP está involucrado en la captación hepática del Ejemplo 1 en el ratón y que la participación de este transportador afecta el reparto.

Farmacocinética en perros

- 15 Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* del Ejemplo 1 se demuestran mediante el uso de perros Beagle (alimentados, n=3-4). El Ejemplo 1 se administra mediante una dosis única oral (PO; 3 mg/kg; volumen de 2 ml/kg) o intravenosa (IV; 1 mg/kg; volumen de 1 ml/kg) en el vehículo. Se extrae sangre de cada animal a las
- 20 0, 0.03 (solo grupo IV), 0.08 (IV), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32 (IV), 48 (IV) y 72 (IV) h después de la dosificación. Las concentraciones en plasma del Ejemplo 1 se determinan mediante un método LC-MS/MS como se describe anteriormente.

- Para las dosis PO, la semivida promedio del Ejemplo 1 es de 6.9 horas y la biodisponibilidad es de ~93 %. Para las dosis IV, la semivida promedio del Ejemplo 1 es de 7.4 horas y el aclaramiento promedio es de 2.52 ml/hr/kg con un bajo
- 25 volumen de distribución (1.33 L/kg). Estos datos muestran que el Ejemplo 1 tiene un aclaramiento total bajo, un bajo volumen de distribución y una alta biodisponibilidad oral en perros.

 La caracterización de las principales vías de eliminación *in vivo* se demuestra mediante el uso de perros beagle con el conducto biliar canulado (BDC)

(alimentados; n=3). El Ejemplo 1 se administra mediante una dosis única intravenosa (IV; 1 mg/kg; volumen de 1 ml/kg) en el vehículo. Se extrae sangre de cada animal a las 0, 0.033, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 y 72 h después de la dosificación. Se extrae bilis de cada animal a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 32, 48 y 72 h después de la dosificación. Se recolecta orina a las 12, 24, 48 y 72 h y se recolectan las heces a las 24, 48 y 72 h después de la dosificación. Las concentraciones en plasma, bilis, orina y heces del Ejemplo 1 se determinan mediante un método LC-MS/MS tal como se describe anteriormente.

La semivida promedio del Ejemplo 1 es de 2.9 horas y el aclaramiento promedio es de 4.69 ml/hr/kg con un bajo volumen de distribución (0.546 L/kg). Los niveles de orina del Ejemplo 1 son despreciables y el ~10 % de la dosis intravenosa administrada se recupera en la bilis. Estos datos muestran que el Ejemplo 1 tiene una baja eliminación renal y biliar. En general, la semivida de eliminación en perros con el conducto biliar canulado, de 2.9 horas, es más rápida que la semivida medida en los perros intactos, de 7.4 horas, lo que sugiere una recirculación enterohepática.

Farmacocinética en monos cynomolgus

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* del Ejemplo 1 se demuestran mediante el uso de monos cynomolgus. Los compuestos se administran mediante una dosis única oral (PO; 10 mg/kg; volumen de 5 ml/kg) en el vehículo. Se extrae sangre de cada animal a las 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 y 72 h después de la dosificación. Las concentraciones en plasma del Ejemplo 1 se determinan mediante un método LC-MS/MS como se describe anteriormente.

La semivida promedio del Ejemplo 1 es de 15.3 horas. Este dato muestra que el Ejemplo 1 está biodisponible por vía oral y se elimina lentamente en monos.

Aclaramiento intrínseco en hepatocitos humanos (-/+ ABT)

Este método está destinado a identificar el aclaramiento metabólico *in vitro* por el agotamiento del sustrato en los hepatocitos. Se utiliza la incubación en

presencia y ausencia de ABT, un inhibidor de la enzima pan-CYP450, para estimar la contribución del metabolismo mediado por CYP. Los hepatocitos humanos crioconservados se descongelan a 37 °C, se centrifugan y se reconstituyen en medios de mantenimiento de hepatocitos a una densidad de 1×10^6 células viables/ml. En una placa de 96 pocillos precalentada, se añaden 196 µl de la suspensión de hepatocitos a cada pocillo. Las células se preincuban con y sin ABT de la siguiente manera: para la preincubación con ABT, se añaden 2 µl de solución de ABT 100 mM (se añaden 2 µl del medio sin ABT a las muestras de control) y la placa se incuba a 37 °C durante 30 minutos bajo agitación constante (~600 rpm). A continuación, se añaden 2 µl de una solución madre de 30 µM de artículo de prueba y, a los 0, 15, 30, 60, 120, 240 minutos, se toman alícuotas de 20 µl y se inactivan mediante transferencia a ACN que contiene el estándar interno. Después de la centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos, las concentraciones de sobrenadante se determinan mediante LC-MS/MS. El aclaramiento se calcula a partir de la pendiente del % de compuesto restante a lo largo del tiempo.

El aclaramiento del Ejemplo 1 se inhibe por ABT en ~12 % en los hepatocitos humanos, lo que sugiere una participación limitada de las enzimas CYP en la eliminación hepática del Ejemplo 1.

20 Inhibición de OATP1B1 y OATP1B3

Las células OATP1B1, OATP1B3 y de control del vector (VC) se cultivan en CO₂ al 5 % a 37 °C en una atmósfera humidificada en DMEM suplementado con FBS al 10%, 50 µg/ml de gentamicina, y 5 µg/ml de blasticidina. Las células se siembran en placas de poli-d-lisina BioCoat de 24 pocillos. Las células se tratan con butirato sódico 5 mM en DMEM suplementado 24 h antes de la experimentación. Los cultivos celulares se lavan dos veces con PBS precalentada antes de la experimentación. Después del lavado, todos los tipos de células se incuban durante 30 minutos a 37 °C en 200 µl de amortiguador, en el amortiguador con diversas concentraciones del artículo de prueba, o con un inhibidor de control positivo

apropiado. En función de los datos preliminares, se analizan concentraciones de 0.025 a 12.5 μM para OATP1B1 y de 0.20 a 100 μM para OATP1B3 (nominal). Al comienzo de la preincubación, se eliminan 50 μl de amortiguador para determinar las concentraciones del artículo de prueba en el pocillo mediante LC-MS/MS.

- 5 Después del período de preincubación, el amortiguador se elimina. Los experimentos se inician mediante la adición de 200 μl de solución de sustrato (400 nM de rosuvastatina total, inclusive rosuvastatina tritiada 1.4 nM). Las incubaciones se realizan con y sin inhibidor. El inhibidor de control positivo utilizado para cada línea celular es 50 μM de rifamicina SV. Los experimentos se llevan a cabo durante
- 10 1 minuto a 37 °C, luego del cual se detiene la reacción y se lava con la adición de 1000 μl de PBS helada por pocillo. Luego, cada pocillo se aspira y se lava dos veces más con PBS helada. Las células de cada pocillo se lisan en 400 μl de Triton X 100 al 1 % en PBS (en volumen). Las muestras se toman de cada pocillo de las placas para calcular la radioactividad y la concentración de proteínas en cada
- 15 pocillo se determina mediante el método del ácido bicincínico. Los valores de IC_{50} se determinan ajustando los datos mediante el uso de GraphPad Prism. Las concentraciones nominales se convierten en concentraciones medidas antes del ajuste.

El Ejemplo 1 inhibió OATP1B1 de forma más potente que OATP1B3, con

20 valores de IC_{50} de 0.12 y 5.5 μM , respectivamente.