



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 291 147**

② Número de solicitud: 200702691

⑤ Int. Cl.:

C07D 231/14 (2006.01)

A61K 31/4152 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **15.10.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2008

⑦ Solicitante/s: **Fundación Instituto Mediterráneo para la Biotecnología y la Investigación Sanitaria (IMABIS)**
Avda. Carlos Haya, 82 - Pabellón A, 7 Planta
29010 Málaga, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

⑦ Inventor/es: **Rodríguez de Fonseca, Fernando;**
Macías González, Manuel;
Serrano Criado, María Antonia;
Goya Laza, María Pilar;
Hernán Alvarado, Mario;
Elguero Bertolini, José y
Jagerovic, Nadine

⑦ Agente: **Segura Mac-Lean, Mercedes**

⑤ Título: **Derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, procedimiento de preparación y utilización.**

⑤ Resumen:

Derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, procedimiento de preparación y utilización.

El objeto de la presente invención se refiere a una nueva clase de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos y a sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, que muestran afinidad selectiva por el subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) y que, por tanto, modulan las acciones reguladas por estos receptores, en concreto la inducción de saciedad y control de la ingesta, la disminución de la ganancia de la masa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

ES 2 291 147 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, procedimiento de preparación y utilización.

Objeto de la invención

El objeto de la invención se refiere a una nueva clase de derivados de pirazol y a sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, que muestran afinidad selectiva por el subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) y que, por tanto, modulan las acciones reguladas por estos receptores, en concreto la inducción de saciedad y control de la ingesta, la disminución de la ganancia de la masa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

Antecedentes de la invención

Los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) son una superfamilia perteneciente a los receptores nucleares de hormonas, que son factores de transcripción activados por ligando que juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo de lípidos y de glúcidos.

Tres subtipos de receptores PPAR han sido descritos: PPARalfa, PPARgamma y PPARdelta, véase Kota, B. P. y col. *Pharmacol Res.* 51 (2005): 85. La activación del subtipo PPARgamma por ligandos potencia las acciones de la insulina en el hombre y reduce los niveles de glucosa circulante en los modelos de roedores de diabetes. El receptor de PPARgamma que se expresa en el tejido adiposo, juega una función central en la regulación de la diferenciación de adipocitos *in vitro*. Se conoce menos acerca de la biología del subtipo PPARdelta, aunque parece jugar un papel importante en el control de la hiperglucemia y la hiperlipemia, véase Berger, J. y Moller, D.E. *Annu. Rev. Med.* 53 (2002): 409 y Berger, J. y col. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 6718-6725.

La activación del subtipo PPARalfa por sus ligandos naturales está relacionada con el control de los niveles de lípidos circulantes. Se han descrito ácidos grasos de cadena media y larga y eicosanoides, véase Forman, B. M. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997): 4312, que producen una reducción sustancial de los triglicéridos del plasma, una reducción moderada del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y un efecto de saciedad. Por ello, el subtipo alfa de esta familia de receptores se presenta como una diana terapéutica muy interesante para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas como las dislipemias, enfermedad cardiovascular, diabetes y obesidad, véase Cheng, P.T. y col. *Mini. Rev. Med. Chem.* 5 (2005): 741 y Evans, R.M. y col. *Nature Medicine.* 10 (2004): 1.

Las dislipemias son desórdenes en el metabolismo lipídico que se caracterizan por concentraciones anormales de uno o más tipos de lípidos (ej. Colesterol y Triglicéridos), y/o apolipoproteínas (ej. Tipo A, B, C y E), y/o lipoproteínas (ej. de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL)). La molécula de colesterol es transportada normalmente unida a las lipoproteínas LDL. La elevación de los niveles de esta composición está directamente relacionada con el riesgo de enfermedad coronaria. Un porcentaje más pequeño de la molécula de colesterol es transportada a través de las lipoproteínas HDL, cuya función principal es extraer el colesterol depositado en las paredes arteriales y transportarlo hasta el hígado para su eliminación vía intestino. Se ha descrito que un nivel elevado de HDL-colesterol está asociado con la disminución del riesgo de enfermedad coronaria. Por tanto, en el tratamiento de las dislipemias es igualmente importante tanto disminuir los niveles de LDL-colesterol como elevar los niveles de HDL-colesterol, véase Gordon, T. y col. *Am. J. Med.* 62 (1977): 707, Stampfer, M.J. y col. *N. England J. Med.*, 325 (1991): 373 y Kannel, W.B. y col. *Ann. Internal Med.* 90 (1979): 85-91. En la actualidad se están utilizando clínicamente los derivados de fibrato, como por ejemplo clofibrato, véase Arduini, A. y col. *WO 200219682* (2002), bezafibrato y fenofibrato, véase Cheng, K y col. *WO 20021915845* (2002), para el control de las dislipemias uniéndose al subtipo PPARalfa, controlando así ciertos factores de transcripción implicados en algunos de los procesos anteriormente descritos, véase Linton, M.F. y Fazio, M. *F Curr. Atheroscler. Rep.* 2 (2000): 29.

Además del tratamiento de las dislipemias, se están utilizando agentes agonistas duales de PPARalfa/gamma con potencial uso para el tratamiento de la diabetes tipo 2, véase Henke, B.R. *J. Med. Chem.* 47 (2004): 4118. Distintos glitazonos (derivados de bencil-2,4-tiazolidindiona) han sido aprobados para su uso en el tratamiento de la diabetes. Entre ellos se incluye isaglitazon, véase Ishii, S. y col. *WO 2003018010* (2003), troglitazon, rosiglitazon y pioglitazon, véase Hulin, B. y col. *Current Pharm. Design.* 2 (1996): 85. Están en desarrollo o en distintas fases de investigación clínica nuevas moléculas que están demostrando una actividad dual como activadores de los subtipos PPARalfa y gamma como el KRP-297, véase Murakami, K. *Biochem. J.* 353 (2001): 231, algunos tiazoles, véase Chen, S. *WO 2001021602* (2001) y derivados del ácido propiónico, véase Brand, C.L. y col. *WO 2002069994* (2002).

Por último, distintas líneas de investigación se están concentrando en el desarrollo agentes selectivos del subtipo PPARalfa, como los derivados del ácido fenilpropiónico, véase Nombra, M. y col. *J. Med. Chem.* 46 (2003): 3581, o los de triazol y triazolona LY518674, véase Xu, Y. y col. *Med. Chem.* 46 (2003): 5121, como potencial tratamiento en enfermedades relacionadas con desórdenes del perfil lipídico y composición de grasa corporal.

Aunque los agentes actuales están dando buenos resultados en el tratamiento de algunas enfermedades como la diabetes, todavía se hace necesario seguir buscando nuevos compuestos con potencial terapéutico contra nuevas enfer-

medades, que no presenten los problemas de efectos adversos mostrados por los actuales, sobre todo los relacionados con hepatotoxicidad, véase *Harold, E y col. Diabetes Care. 25 (2002): 815*.

En cuanto a las estructuras químicas, en la presente invención se describen derivados de diarilpirazol con grupos amida de ácidos grasos en el anillo. Existen en la literatura, véase a) *Thomas B. F., Francisco M. Y., Seltzman H. H., Thomas J. B., Fix S. E., Schulz A., Gilliam A. F., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Bioorg. Med. Chem., 2005, 13, 5463*. b) *Wiley J. L., Jefferson R. G., Grier M. C., Mahadevan A. Razdan R. K., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 296 (3), 1013*. c) *Jagerovic N. y col., Pat. Esp. P200502196 (2005)*. d) *Martin B. R. y col., patente US 6509367*, algunas estructuras relacionadas en las cuales generalmente el anillo de pirazol lleva un metilo en posición 4 mientras que en los compuestos aquí reivindicados en dicha posición hay un hidrógeno. Con respecto de su función como activadores PPARalfa sólo se encuentran referencias al anillo de pirazol como sustituyente en compuestos de tipo aromático véase *Jeppesen y col. US 6407127 B2, Jeppesen y col. US 6602901 B2 y Evans y col. US 6214850*, sin llegar a entrar en conflicto con la estructura base de la que forma parte en este estudio.

15 Explicación de la invención

La invención se refiere a una nueva clase de moléculas, concretamente derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, así como a su procedimiento de preparación y su utilización.

Estas moléculas pueden ser utilizadas para la preparación de un medicamento para la inducción de saciedad y control de la ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico así como la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Fórmula estructural de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos.

Figura 2: Esquema del procedimiento de preparación de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos.

Figura 3: Fórmula del 5-(4-clorofenil)-1-fenilpirazol-3-carboxilato de etilo.

Figura 4: Fórmula del 1,5-di-(4-clorofenil)pirazol-3-carboxilato de etilo.

Figura 5: Fórmula de *N*-(Oleil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida.

Figura 6: Fórmula de *N*-(Oleil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida.

Figura 7: Fórmula de *N*-(Hexadecil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida.

Figura 8: Fórmula de *N*-(Hexadecil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida.

Figura 9: Interacción entre PPARalfa y el coactivador TIF2 inducidos por ligando por GST pull down. El valor del vector con solo GST fue restado de todos los compuestos y disolvente (DMSO). Las muestras fueron detectadas y cuantificadas con respecto a la cantidad de PPARalfa utilizada en un Fosfoimager (Fuji FLA 300 reader). Se muestra un gel al 15% SDS-PAGE.

Descripción de la invención

La presente invención es continuación de un proyecto anterior en el que se describió al ácido graso endógeno oleiletanolamida (OEA) como un nuevo ligando capaz de activar al subtipo PPARalfa y su acción como inductor de saciedad y controlador de la ingesta en ratas, inhibidor de la ganancia de la masa corporal y el regulador del metabolismo lipídico, véase *Piomelli, D y Rodríguez de Fonseca, F. US 6911474 (2005)*.

Los compuestos descritos a continuación son una nueva clase de moléculas derivados sustituidos del pirazol que, en general, fueron capaces de inducir la interacción entre PPARalfa y sus coactivadores en solución, algunos de ellos, incluso con mayor efectividad que la OEA, mediante ensayos *in vitro*. Además mostraron efectos similares a los de la molécula de referencia en los ensayos *in vivo*.

Por tanto, estos nuevos compuestos son útiles en la mejora de las condiciones fisiológicas reguladas por agonistas de los receptores PPAR alfa, como por ejemplo los relacionados con la modulación de la grasa corporal y la inhibición de la ingesta, mostrando así, gran potencial de aplicación en el tratamiento de las enfermedades o situaciones patológicas derivadas de las anteriores condiciones, al tiempo que pueden disminuir los efectos adversos de los tratamientos actuales.

Los compuestos de la presente invención corresponden a derivados de pirazol con sustituyentes arilos en posiciones 1 y 5, con hidrógeno en posición 4 y grupos carboxamida en posición 3 que corresponden a la fórmula A (ver Figura 1) donde Xa y Xb son idénticos o diferentes y representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un

ES 2 291 147 A1

átomo de halógeno y R representa grupos alquilo lineal ó alqueno lineal con un número de átomos de C comprendido entre 14 y 20. En particular, el objeto de la presente invención corresponde a los siguientes derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos:

- 5 - *N*-(Oleil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 4 (MA06)
- *N*-(Oleil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 5 (MA016)
- *N*-(Hexadecil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 6 (MA010)
- 10 - *N*-(Hexadecil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 7 (MA017)

La preparación y obtención de los compuestos recogidos se puede realizar según el esquema de reacción descrito en la Figura 2 para la fórmula A. (figura 1)

15 La ruta sintética descrita en la Figura 2 se llevó a cabo inicialmente a través de la preparación del dicetoéster 1, véase Gardner T. S., Wenis E., Lee J., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 1514, a partir de la reacción de la acetofenona y oxalato de dietilo en medio básico.

20 Los ésteres pirazólicos 2-3 fueron preparados, véase a) Finar I. L., Hurlock R. J., *J. Chem. Soc.*, 1958, 3259, por reacción del dicetoéster 1 con la respectiva arilhidrazina en proporciones equimolares durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 48 horas. En general, la reacción ha sido descrita para dar predominantemente el isómero 1*H*-pirazol-3-carboxilato, véase Ashton W. T., Doss G.A., *J. Heterocyclic Chem.*, 1993, 30, 307; b) Murray W. V., Wachter M. P., *J. Heterocyclic Chem.*, 1989, 26, 1389. Previamente a la siguiente transformación, se separa el éster carboxílico mediante extracción con éter seguida de lavado con solución de bicarbonato y agua.

30 Finalmente, la síntesis de los compuestos 4-7 fue llevada a cabo por reacción de la una amina de fórmula general R-NH₂, siendo R una cadena carbonada de entre 14 y 20 átomos de C (por ejemplo oleilamina y 1-hexadecilamina) con el 1,5-diarilpirazol-3-carboxilato de etilo 2-3, empleando para ello Al(CH₃)₃ en CH₂Cl₂, durante un periodo de tiempo comprendido entre 20 y 48 horas, véase Weinreb S. M., Lipton M., Basha A., *Tetrahedron Lett.*, 1977, 4171 (véase Figura 2). La separación de los derivados pirazólicos obtenidos se lleva a cabo mediante lavado, secado y evaporación del disolvente.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en la forma de una sal o un solvato de los mismos siendo ambos farmacéuticamente aceptables. Las sales fisiológicamente aceptables incluyen sales convencionales formadas a partir de los ácidos o bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables, así como las sales de adición de ácidos de amonio cuaternario.

40 En un primer uso, la presente invención se refiere a un método para modular el subtipo alfa de receptores activados por el proliferador de peroxisomas poniendo en contacto el receptor con al menos un compuesto de los representados por la fórmula estructural de la figura 1, y sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en esta memoria descriptiva, un "ligando de PPAR-alfa" es un compuesto que se une a un PPAR-alfa humano y a moléculas coactivadoras para dar lugar a procesos de transcripción tal y como se describe más adelante en el ensayo de unión GST. Se podrán utilizar los derivados pirazólicos de ácidos grasos para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o tratamiento de cualquier patología mediada por los PPAR-alfa.

50 En un segundo uso, la presente invención se refiere a los métodos y composiciones que contienen los productos representados por la fórmula estructural de la figura 1 y sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, que consiguen una disminución del apetito y de la ganancia de la masa corporal cuando son administradas a animales de laboratorio (ej. ratas, ratones, conejos). Se podrán por tanto utilizar los derivados pirazólicos para la preparación de medicamento para la inducción de saciedad y control de la ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico.

55 Otra posible utilización sería para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. En cosmética se podrían emplear particularmente para la reducción de la grasa subcutánea.

60 Los compuestos de esta invención se pueden preparar mediante la química orgánica habitual tal y como se ilustra mediante los ejemplos operativos acompañantes. Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar la síntesis de algunos compuestos particulares de la presente invención y para ejemplificar los procedimientos generales. De acuerdo con lo anterior, la siguiente sección de ejemplos no tiene la intención de limitar de ningún modo el alcance de la invención contemplada en la presente memoria descriptiva.

Modo de realización de la invención

65 Los siguientes ejemplos tienen carácter informativo y en ningún caso limitante de las metodologías empleadas, las cuales pueden ser alteradas con el fin de alcanzar unos resultados similares.

ES 2 291 147 A1

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usadas en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μg (microgramos); l o L (litros); ml o mL (mililitros); μl o μL (microlitros); mmol (milimoles); mol (moles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (desplazamiento químico); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); m (multiplete); RMN (resonancia magnética nuclear); EM (espectro de masas); IE (Impacto electrónico); m/z (Relación masa/carga); AE (Análisis Elemental); Rto (Rendimiento); M (molar); col. (colaboradores); TEA (trietilamina); AcOH (ácido acético); MeOH (metanol); THF (tetrahidrofurano); EtOH (etanol); CH_2Cl_2 (diclorometano); AcOEt (Acetato de etilo); CDCl_3 (cloroformo deuterado); DMSO (dimetilsulfóxido); GST (sulfur-transferasa de glutatión); PBS (búfer fosfato salino); TIF2 (factor intermediario de transcripción 2). Salvo que se indique lo contrario, todas las temperaturas se expresan en $^{\circ}\text{C}$ (grados Celsius).

15 Derivados

Ejemplo 1

Preparación y obtención de los 1,5-diarilpirazol-3-carboxilato de etilo, 2-3

Procedimiento general

A una solución del 4-(4-clorofenil)-2,4-dioxobutanoato de etilo 1 en ácido acético glacial (10 ml) fue adicionada una cantidad equimolar de la arilhidrazina. La solución fue refluida y a continuación elaborada volcando la solución sobre agua (15 ml). El aceite amarillento fue separado por extracción con éter (3 x 50 ml) y el extracto orgánico fue lavado con solución de bicarbonato de sodio (3 x 15 ml) y agua (3 x 15 ml). El extracto fue secado (Na_2SO_4) y tras posterior rotaevaporación del disolvente se obtuvo predominantemente el isómero 1*H*-pirazol-3-carboxilato como un aceite amarillo viscoso el cual se purificó por cromatografía de columna sobre sílica gel utilizando como eluyente AcOEt/Hexano(1/9).

El compuesto representado en la Figura 3 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 3,0 g (11,78 mmol) del 4-(4-clorofenil)-2,4-dioxobutanoato de etilo 1 y 1,27 g (11,78 mmol) de fenilhidrazina en ácido acético glacial (10 ml). La disolución fue refluida durante 24 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 3,03 g de un sólido amarillo.

Rto: 79%; P.f.: 94-95 $^{\circ}\text{C}$.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,29-7,18 (m, 7H, $H_s(2)\text{Ar}$, H_s Ph); 7,07 (d, 2H, $|J|= 8,5$ Hz, $H_s(3)\text{Ar}$); 6,95 (s, 1H, $H(4)\text{Pir}$); 4,38 (q, 2H, $|J|= 7,0$ Hz, CH_2CH_3); 1,34 (t, 3H, $|J|= 7,0$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162,2 (CO); 144,3 (C(3)Pir); 143,3 (C(5)Pir); 139,2 (C(1)Ph); 134,8 (C(1)Ar); 129,8 (C(3)Ar); 129,0 (C(3)Ph); 128,8 (C(2)Ar); 128,7 (C(4)Ar); 127,9 (C(4)Ph); 125,6 (C(2)Ph); 109,9 (C(4)Pir); 61,1 (CH_2); 14,3 (CH_3).

EM (IE): $m/z= [M+1]^+$ 329 (32%); $[M-1]^+$ 327 (100%).

El compuesto representado en la Figura 4 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 3,0 g (11,78 mmol) del 4-clorofenil-2,4-dioxobutanoato de etilo 1 y 2,11 g (11,78 mmol) del clorhidrato de 4-clorofenilhidrazina en ácido acético glacial (10 ml). La disolución fue refluida durante 48 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 2,55 g de un sólido amarillo.

Rto: 60%; P.f.: 120-121 $^{\circ}\text{C}$.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,29-7,23 (m, 4H, $H_s(2)\text{Ar}_1$, $H_s(2)\text{Ar}_5$); 7,20 (d, 2H, $|J|= 8,5$ Hz, $H_s(3)\text{Ar}_5$); 7,08 (d, 2H, $|J|= 8,3$ Hz, $H_s(3)\text{Ar}_1$); 6,95(s, 1H, $H(4)\text{Pir}$); 4,39 (q, 2H, $|J|= 7,1$ Hz, CH_2CH_3); 1,35 (t, 3H, $|J|= 7,1$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162,0 (CO); 144,7 (C(3)Pir); 143,4 (C(5)Pir); 137,7 (C(1)Ar₅); 135,1 (C(1)Ar₁); 134,3 (C(4)Ar₅); 129,9 (C(3)Ar₅); 129,3 (C(3)Ar₁); 129,0 (C(2)Ar₅); 127,6 (C(4)Ar₁); 126,7 (C(2)Ar₁); 110,2 (C(4)Pir); 61,2 (CH_2); 14,4 (CH_3).

EM (IE): $m/z= [M+1]^+$ 362 (64%); $[M-1]^+$ 360 (94%); 288 (100%).

ES 2 291 147 A1

Ejemplo 2

Preparación y obtención de las 1,5-diaril-1H-pirazol-3-carboxamidas, 4-7

5 Procedimiento general

10 A la respectiva amina (5 equiv) en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml) fue adicionada gota a gota durante 5 minutos una solución comercial 2M de Al(CH₃)₃ en heptano (5 equiv) y agitada durante una hora a temperatura ambiente. Tras la agitación, una solución del respectivo 1H-pirazol-3-carboxilato 2-3 (1 equiv) en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml) fue adicionada y la mezcla fue refluida. La reacción fue elaborada por adición lenta y cuidadosa de una solución 2N HCl (50 ml). La fase orgánica fue lavada con una solución 2N HCl (3 x 15 ml) y secada sobre Na₂SO₄. El disolvente CH₂Cl₂ fue evaporado al vacío y purificado por cromatografía de columna sobre sílica gel utilizando como eluyente AcOEt/Hexano(1/4).

15 El compuesto representado en la Figura 5 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 0,61 g (2,29 mmol) de la oleilamina comercial disuelta en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), 1,15 ml (2,29 mmol) de la solución comercial 2M de Al(CH₃)₃ en heptano y 0,15 g (0,45 mmol) de 5-(4-clorofenil)-1-fenilpirazol-3-carboxilato de etilo 2 disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 0,22 g de una cera amarilla.

20 **Rto:** 90%;

25 **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,34-7,19 (m, 7H, *H_s*(2)Ar, *H_s* Ph); 7,07 (d, 2H, |*J*|= 8,5 Hz, *H_s*(3)Ar); 6,96(s, 1H, *H*(4)Pir); 5,32-5,25 (m, 2H, CH=CH); 3,38 (q, 2H, |*J*|= 6,8 Hz); 1,94-1,90 (m, 4H); 1,55-1,49 (m, 2H); 1,22-1,18 (m, 22H); 0,80 (t, 3H, |*J*|= 6,7 Hz, CH₃).

30 **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 161,5 (CO); 147,4 (C(3)Pir); 143,6 (C(5)Pir); 139,3 (C(1)Ph); 134,7 (C(1)Ar); 129,8 (C(3)Ar); 129,7 (CH=CH); 129,1 (C(3)Ph); 128,8 (C(2)Ar); 128,3 (C(4)Ar); 128,1 (C(4)Ph); 125,3 (C(2)Ph); 108,1 (C(4)Pir); 39,2 (CONH-CH₂); 32,5 (CH₂-CH=CH-CH₂); 31,8 (CH₂-CH₂-CH₃); 31,7 (CONHCH₂-CH₂); 29,7-29,1 ((CH₂)₄-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₃); 27,1 (CH₂-(CH₂)₂-CH₃); 26,9 (CONH(CH₂)₂-CH₂); 22,6 (CH₂CH₃); 14,0 (CH₃).

EM (IE): *m/z*= [M+1]⁺ 547 (42%); [M-1]⁺ 549 (20%); 281 (100%).

35 **AE:** Calculado (C₃₄H₄₆ClN₃O, 547,33) C: 74,49; H: 8,46; N: 7,67. Encontrado C: 74,76; H: 8,70; N: 7,91.

40 El compuesto de la Figura 6 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 0,92 g (3,46 mmol) de la oleilamina comercial disuelta en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), 1,73 ml (3,46 mmol) de la solución comercial 2M de Al(CH₃)₃ en heptano y 0,25 g (0,69 mmol) del 1,5-di-(4-clorofenil)pirazol-3-carboxilato de etilo 3 disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), la mezcla se calentó a reflujo durante 20 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 0,35 g de una cera amarilla.

Rto: 88%

45 **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,30-7,19 (m, 4H, *H_s*(2)Ar₁, *H_s*(2)Ar₅); 7,17 (d, 2H, |*J*|= 8,7 Hz, *H_s*(3)Ar₅); 7,08 (d, 2H, |*J*|= 8,4 Hz, *H_s*(3)Ar₁); 6,96(s, 1H, *H*(4)Pir); 5,31-5,25 (m, 2H, CH=CH); 3,38 (q, 2H, |*J*|= 6,7 Hz); 1,94-1,90 (m, 4H); 1,54-1,49 (m, 2H); 1,22-1,18 (m, 22H); 0,80 (t, 3H, |*J*|= 6,7 Hz, CH₃).

50 **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 161,3 (CO); 147,7 (C(3)Pir); 143,7 (C(5)Pir); 137,8 (C(1)Ar₅); 135,0 (C(1)Ar₁); 134,2 (C(4)Ar₅); 129,9 (C(3)Ar₅); 129,7 (CH=CH); 129,3 (C(3)Ar₁); 129,0 (C(2)Ar₅); 127,9 (C(4)Ar₁); 126,5 (C(2)Ar₁); 108,4 (C(4)Pir); 39,2 (CONH-CH₂); 32,5 (CH₂-CH=CH-CH₂); 31,8 (CH₂-CH₂-CH₃); 31,7 (CONHCH₂-CH₂); 29,7-29,2 ((CH₂)₄-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₃); 27,2 (CH₂-(CH₂)₂-CH₃); 26,9 (CONH(CH₂)₂-CH₂); 22,6 (CH₂CH₃); 14,5 (CH₃).

55 **EM (IE):** *m/z*= [M+1]⁺ 583 (13%); [M-1]⁺ 581 (19%); 315 (100%).

AE: Calculado (C₃₄H₄₅Cl₂N₃O, 581,29) C: 70,09; H: 7,78; N: 7,21. Encontrado C: 70,23; H: 7,48; N: 7,25.

60 El compuesto de la Figura 7 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 0,92 g (3,82 mmol) de la 1-hexadecilamina comercial disuelta en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), 1,91 ml (3,82 mmol) de la solución comercial 2M de Al(CH₃)₃ en heptano y 0,25 g (0,76 mmol) de 5-(4-clorofenil)-1-fenilpirazol-3-carboxilato de etilo 2 disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), la mezcla se calentó a reflujo durante 48 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 0,36 g de un sólido blanco.

Rto: 93%; P.f.: 59-60°C (Hexano).

65 **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,33-7,31 (m, 2H, *H_s*(2)Ar); 7,23-7,19 (m, 5H, *H_s* Ph); 7,08 (d, 2H, |*J*|= 8,4 Hz, *H_s*(3)Ar); 6,97(s, 1H, *H*(4)Pir); 3,38 (q, 2H, |*J*|= 6,7 Hz); 1,56-1,51 (m, 2H); 1,30-1,17 (m, 26H); 0,82 (t, 3H, |*J*|= 6,9 Hz, *H_s*(3), CH₃).

ES 2 291 147 A1

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 162,5 (CO); 147,4 (C(3)Pir); 143,6 (C(5)Pir); 139,3 (C(1)Ph); 134,7 (C(1)Ar); 129,9 (C(3)Ar); 129,0 (C(3)Ph); 128,8 (C(2)Ar); 128,3 (C(4)Ar); 128,1 (C(4)Ph); 125,7 (C(2)Ph); 108,5 (C(4)Pir); 39,6 (CONH-CH₂); 32,3 (CONHCH₂-CH₂); 30,1-29,7 (CONH(CH₂)₃-(CH₂)₁₁); 27,4 (CONH(CH₂)₂-CH₂); 23,0 (CH₂CH₃); 14,5 (CH₃).

5

EM (IE): $m/z = [M+1]^+ 523$ (5%); $[M-1]^+ 521$ (13%); 281 (100%).

AE: Calculado (C₃₂H₄₄ClN₃O, 521,32) C: 76,31; H: 8,49; N: 8,05. Encontrado C: 73,90; H: 8,44; N: 7,95.

10 El compuesto de la Figura 8 se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como reactivo de partida 0,83 g (3,46 mmol) de la 1-hexadecilamina comercial disuelta en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), 1,73 ml (3,46 mmol) de la solución comercial 2M de Al(CH₃)₃ en heptano y 0,25 g (0,69 mmol) del 1,5-di-(4-clorofenil)pirazol-3-carboxilato de etilo 3 disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), la mezcla se calentó a reflujo durante 20 horas y se trató como se describe en el procedimiento general; se obtuvieron 0,34 g de un sólido blanco.

15

Rto: 90%; P.f.: 78-79°C (Hexano).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,30-7,19 (m, 4H, H_s(2)Ar₁, H_s(2)Ar₅); 7,17 (d, 2H, |J|= 8,7 Hz, H_s(3)Ar₅); 7,07 (d, 2H, |J|=6,7 Hz, H_s(3)Ar₁); 6,96(s, 1H, H(4)Pir); 3,38 (q, 2H, |J|=7,0 Hz); 1,58-1,49 (m, 2H); 1,29-1,17 (m, 26H); 0,80 (t, 3H, |J|= 6,7 Hz, H_s(3), CH₃).

20

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 161,3 (CO); 147,7 (C(3)Pir); 143,7 (C(5)Pir); 137,8 (C(1)Ar₅); 135,0 (C(1)Ar₁); 134,2 (C(4)Ar₅); 129,9 (C(3)Ar₅); 129,3 (C(3)Ar₁); 129,0 (C(2)Ar₅); 128,3 (C(4)Ar₁); 126,9 (C(2)Ar₁); 108,4 (C(4)Pir); 39,6 (CONH-CH₂); 32,3 (CONHCH₂-CH₂); 30,1-29,7 (CONH(CH₂)₃-(CH₂)₁₁); 27,3 (CONH(CH₂)₂-CH₂); 23,0 (CH₂CH₃); 14,5 (CH₃).

25

EM (IE): $m/z = [M+1]^+ 557$ (10%); $[M-1]^+ 555$ (15%); 315 (100%).

AE: Calculado (C₃₂H₄₃Cl₂N₃O, 555,28) C: 69,05; H: 7,79; N: 7,55. Encontrado C: 68,89; H: 7,51; N: 7,73.

30

Ensayo in vitro de interacción proteína PPARalfa con proteína de fusión TIF2 Y GST (GST-Pull-down Assays)

35 La precipitación a través de GST (también conocida como GST-pull down) es un método *in vitro* utilizado para determinar y cuantificar la existencia de interacciones físicas entre proteínas, siendo útil para confirmar en nuestro caso la interacción del factor de transcripción PPAR-α y el coactivador TIF2 inducida por ligando, véase Macias-Gonzalez, M y col. *J. Biol. Chem.* 277 (2002): 18501. A partir de las resinas 4B sefarosa-glutation con GST solo o GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ al 50% en PBS, se llevó a cabo una centrifugación eliminando el sobrenadante y se añadió a la fase precipitada un tampón de bloqueo para evitar uniones inespecíficas con PBS y albúmina sérica bovina (Aldrich) centrifugando de nuevo. A continuación se añadió tampón de inmunoprecipitación (al 50%) a la fase precipitada. Se tomó 50 μL de la resina sefarosa-glutation con GST o GST-TIF2 en tampón de inmunoprecipitación y se añadió: 20 μL de PPAR-α marcado con ³⁵[S] preincubado con OEA, GW7647 (Tocris, Bioscience) y compuestos sintéticos (MA006, MA010, MA016 y MA017), 8 pL del mismo ligando en 100% DMSO y 22 μL de tampón de inmunoprecipitación durante 20 minutos a 30°C y 40 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, las proteínas marcadas que no resultaron en una fusión con GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ unidos a resinas sefarosa por glutation fueron lavadas con el tampón de 45 inmunoprecipitación después de centrifugar a máxima velocidad.

50 Desechado el sobrenadante, la fase precipitada con los complejos marcados unidos a sefarosa se resuspendió con tampón de carga de proteínas (a proporción 1:1 en volumen) y se calentó en agitación unos 95°C durante 5 minutos, separando la resina sefarosa del complejo GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ con ³⁵S PPARalfa tras una nueva centrifugación de 5 minutos a máxima velocidad. A continuación, se cargaron las diferentes muestras del sobrenadante en el gel y se realizó una electroforesis SDS-PAGE a 100 V durante 1 hora aproximadamente. Finalmente, se cuantificaron y visualizaron los geles sobre un lector Fuji FL43000 por fosforescencia, con el software Image Gauge (Fuji).

55 Los resultados se muestran en la Figura 9, en la cual las columnas representan el valor medio de al menos 3 experimentos, con su respectiva desviación estándar (Student's t-test *p* values se calcularon con respecto a al disolvente) **p* < 0.05.

Estudios de ingesta de comida: tratamiento agudo

60 Los efectos de los diferentes compuestos sobre la conducta en alimentación fueron analizados en ratas Wistar machos privados de comida durante 24 horas, que fueron habituados a su manipulación, véase Navarro, M y col. 1996 *J. Neurochem.* 67 (1996).1982, Rodríguez de Fonseca, F. y col. *Nature.* 414 (2001):209 y Fu, J y col. *Nature.* 425 (2003):90. Para este fin, 48 horas antes de cada ensayo las ratas se disponían en jaulas individuales, se retiraba el material de base (arena o serrín), y se situaban pequeños contenedores con comida dentro de las jaulas durante 4 65 horas. Pasada esta fase inicial, los animales fueron privados de comida durante 24 horas, siempre con acceso libre al agua. Transcurridas las 24 horas de ayuno, se establecieron distintos grupos de tratamiento (N=8-10 cada grupo) administrándose i.p. distintas dosis de los compuestos pirazólicos correspondientes a cada sesión experimental en su solución vehículo en un volumen de 1 mL/kg, además de un grupo control tratado únicamente con el vehículo:

ES 2 291 147 A1

1) Grupo tratado con dosis 0.03 mg/kg en solución vehículo.

2) Grupo tratado con dosis 0.3 mg/kg en vehículo.

5 3) Grupo con dosis 3 mg/kg en vehículo.

4) Grupo tratado con dosis 10 mg/kg en vehículo sólo para MA-017.

5) Grupo control tratado con el vehículo tween-80 al 5% en suero fisiológico.

10 A los 15 minutos de la administración se colocaban los contenedores con una cantidad de comida conocida (normalmente 30-40 g) y una botella de agua fresca. Estos contenedores de comida se pesaron a los 30, 60, 120 y 240 minutos después de su presentación, de modo que fue controlada la comida ingerida por cada animal (ver Figuras 10 a 13).

15

20

25

30

35

40

45

50

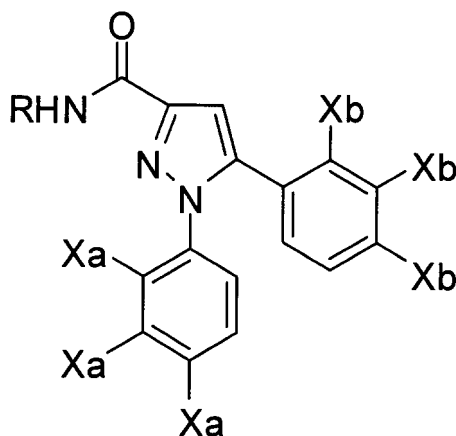
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa que corresponden a la fórmula A:



en la cual:

- los sustituyentes arilos en posiciones 1 y 5 del anillo pirazólico incluyen grupos Xa y Xb que pueden ser idénticos o diferentes y representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno,

- el grupo carboxamida en posición 3 incluye una cadena R que representa grupos alquilo lineal ó alqueno lineal,

caracterizados porque en la posición 4 del anillo pirazólico hay un átomo de hidrógeno y porque la cadena R del grupo carboxiamida esta formada por un número de átomos de carbono comprendido entre 14 y 20.

2. Derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichos derivados son:

- *N*-(Oleil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 4 (MA06)

- *N*-(Oleil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 5 (MA016)

- *N*-(Hexadecil)-5-(4-clorofenil)-1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 6 (MA010)

- *N*-(Hexadecil)-1,5-di-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida, 7(MA017)

3. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:

a) Reacción entre acetofenona y oxalato de dietilo en medio básico para preparar un dicetoéster.

b) reacción entre el dicetoéster y una arilhidracina en proporciones equimolares durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 48 horas, para obtener ésteres carboxílicos de pirazoles.

c) separación del éster carboxílico obtenido en la etapa anterior mediante extracción con éter, lavado con solución de bicarbonato de sodio y agua.

d) secado del extracto de la etapa anterior y evaporación del disolvente.

e) transformación en un solo paso de los ésteres carboxílicos de los pirazoles obtenidos y separados en las etapas anteriores mediante reacción con aminas de fórmula general R-NH₂, siendo R una cadena carbonada de entre 14 y 20 átomos de C, en presencia de trimetilaluminio y utilizando diclorometano como disolvente, durante un periodo de tiempo comprendido entre 20 y 48 horas, para obtener los derivados pirazólicos de amidas.

f) separación de los derivados pirazólicos de amidas obtenidos mediante lavado, secado y evaporación del disolvente.

4. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el dicetoéster utilizado es el 4-clorofenil-1,3-dioxobutanoato de etilo y la arilhidracina es la fenilhidracina.

ES 2 291 147 A1

5. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el dicetoéster utilizado es el 4-clorofenil-1,3-dioxobutanoato de etilo y la arilhidracina es la clorofenilhidracina.

5 6. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la amina utilizada es oleilamina.

7. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa según las reivindicaciones 3 y 5, **caracterizado** porque la amina utilizada es oleilamina.

10

8. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la amina utilizada es hexadecilamina.

15

9. Procedimiento de preparación de derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos como activadores específicos de receptores PPAR-alfa según las reivindicaciones 3 y 5, **caracterizado** porque la amina utilizada es hexadecilamina.

20

10. Utilización de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos según las reivindicaciones 1 y 2 para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o tratamiento de una patología mediada por el subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR).

11. Utilización de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos según la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para la inducción de saciedad y control de la ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico.

25

12. Utilización de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos según la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.

30

13. Utilización de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos para la preparación de un compuesto de uso cosmético, particularmente para la reducción de la grasa subcutánea.

14. Sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los derivados pirazólicos de amidas de ácidos grasos según las reivindicaciones 1 y 2.

35

40

45

50

55

60

65

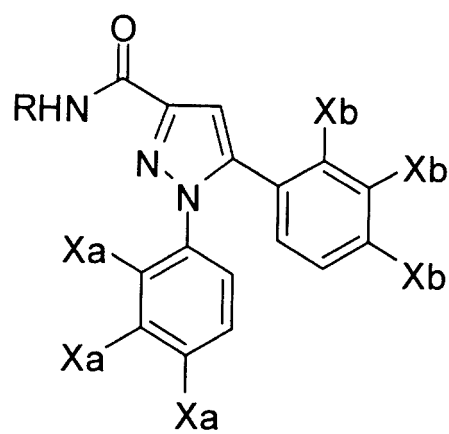


Figura 1

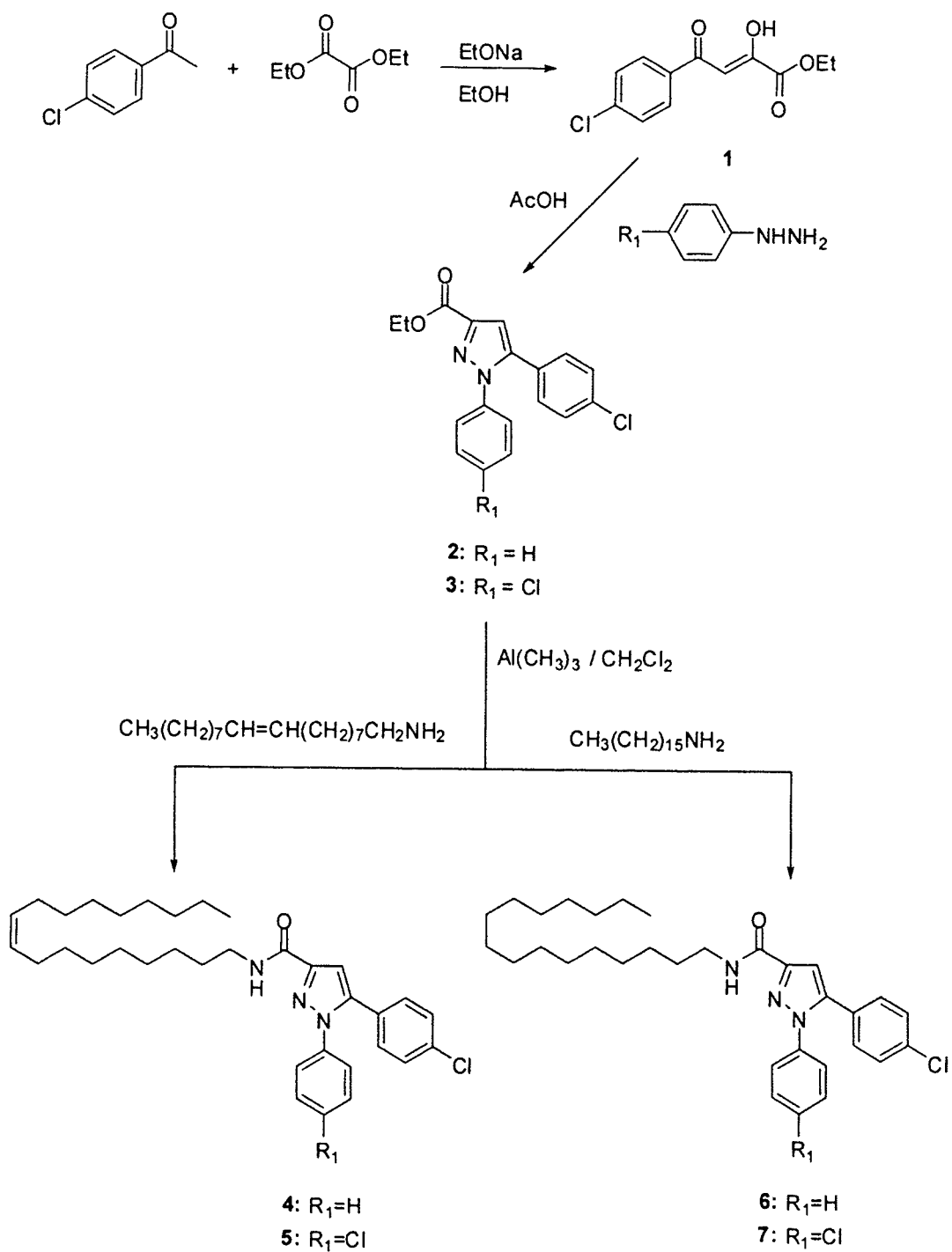


Figura 2

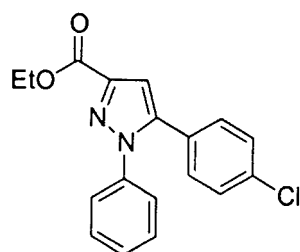


Figura 3

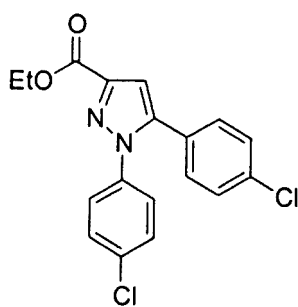


Figura 4

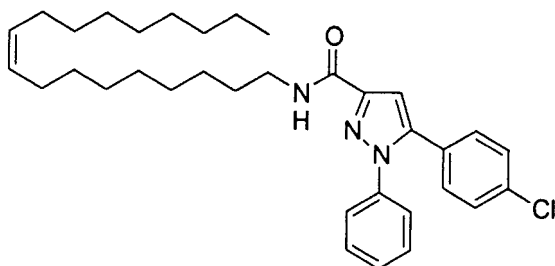


Figura 5

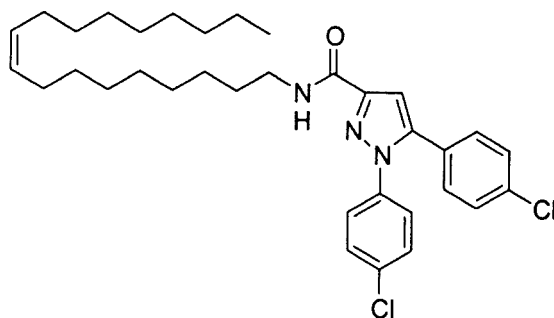


Figura 6

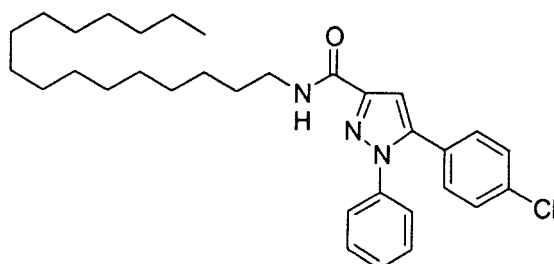


Figura 7

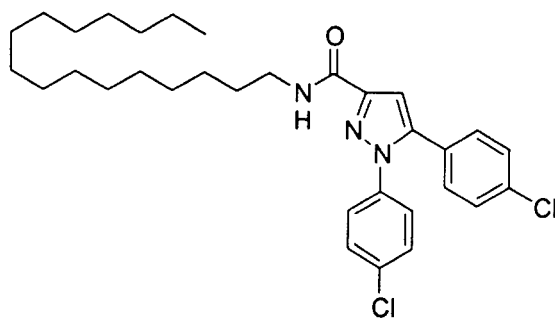


Figura 8

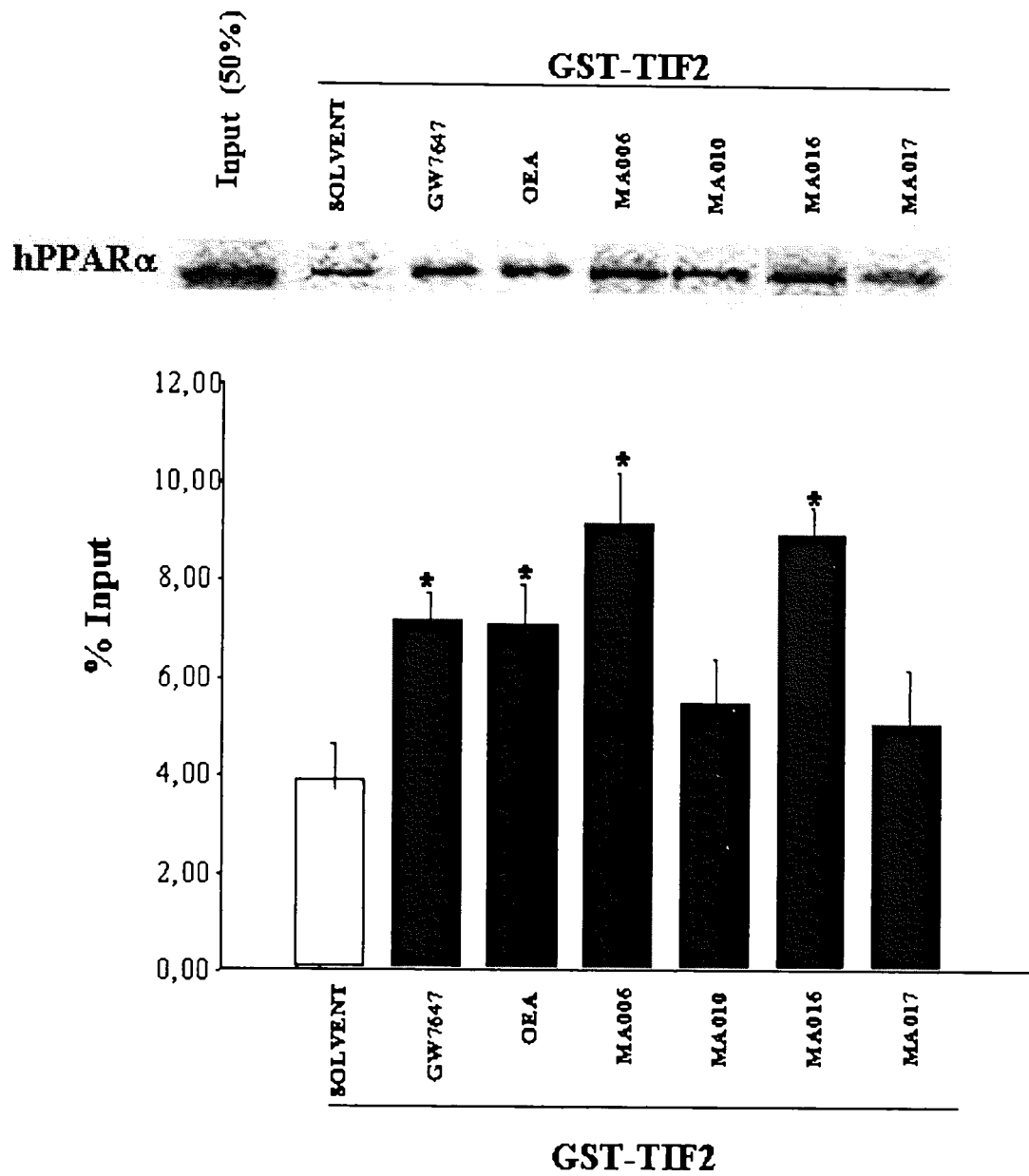


Figura 9

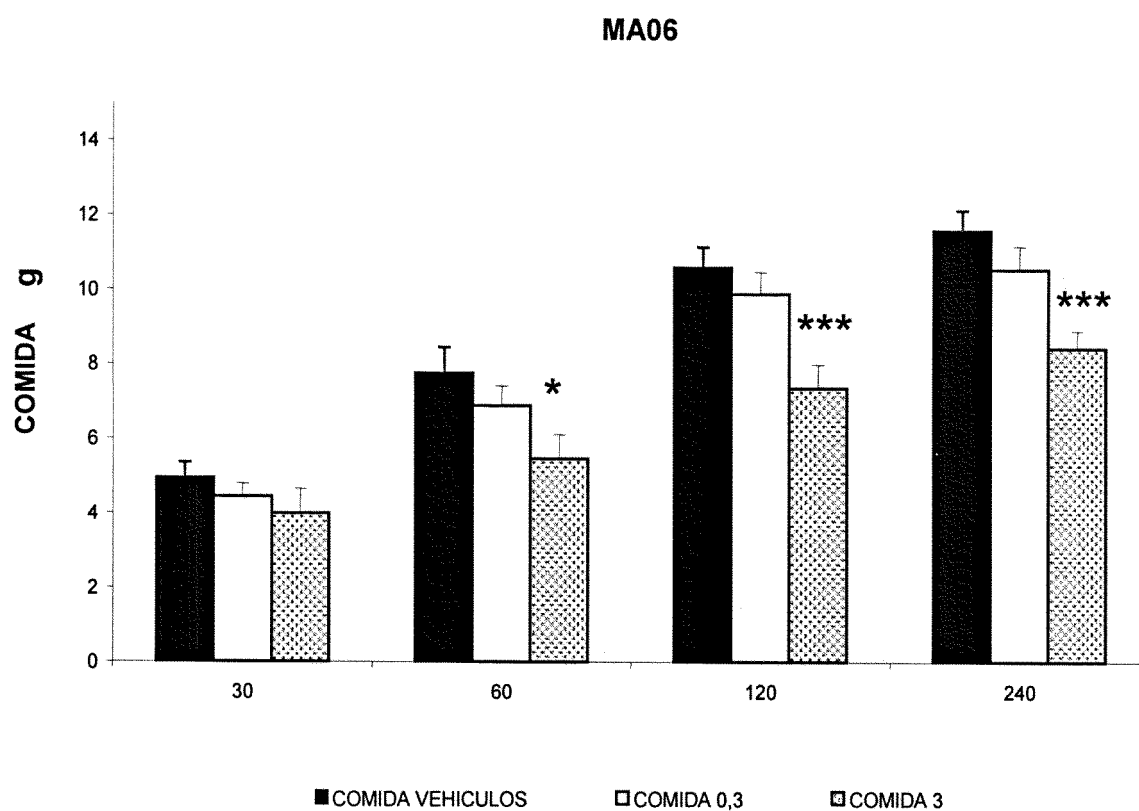


Figura 10

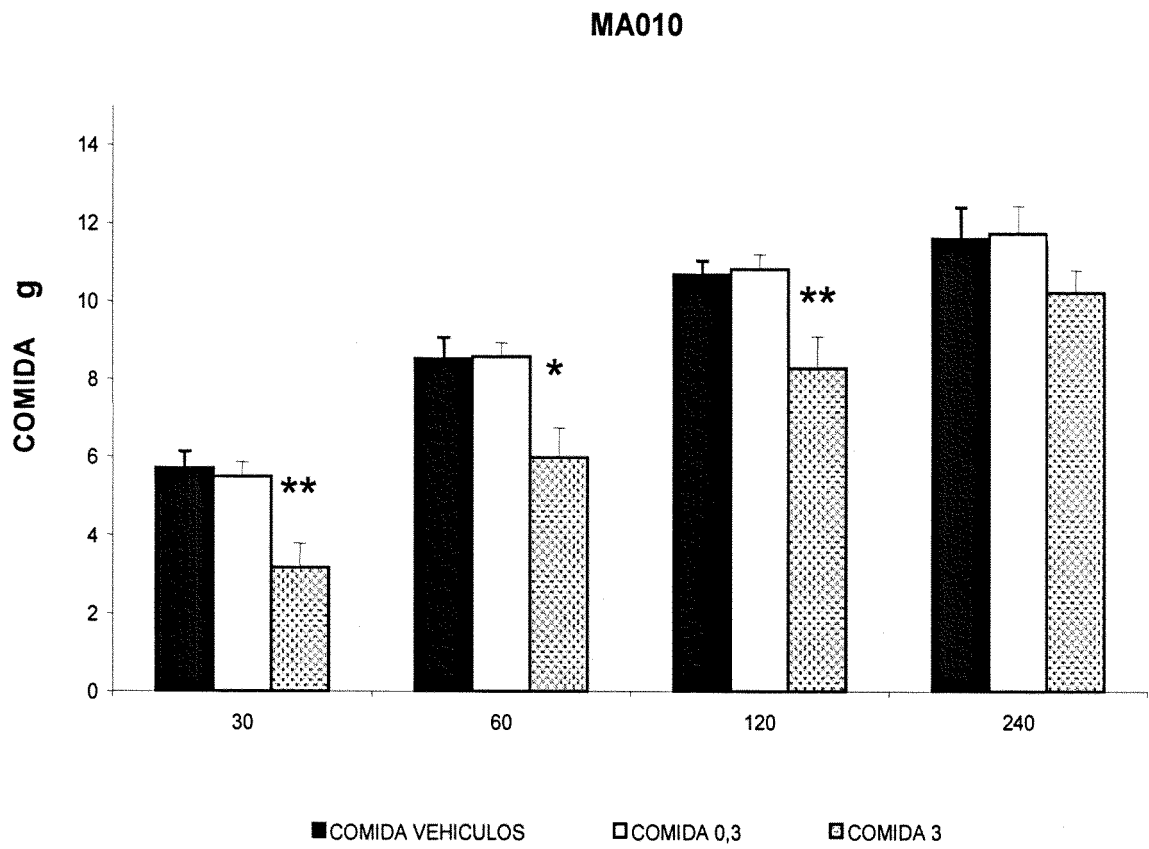


Figura 11

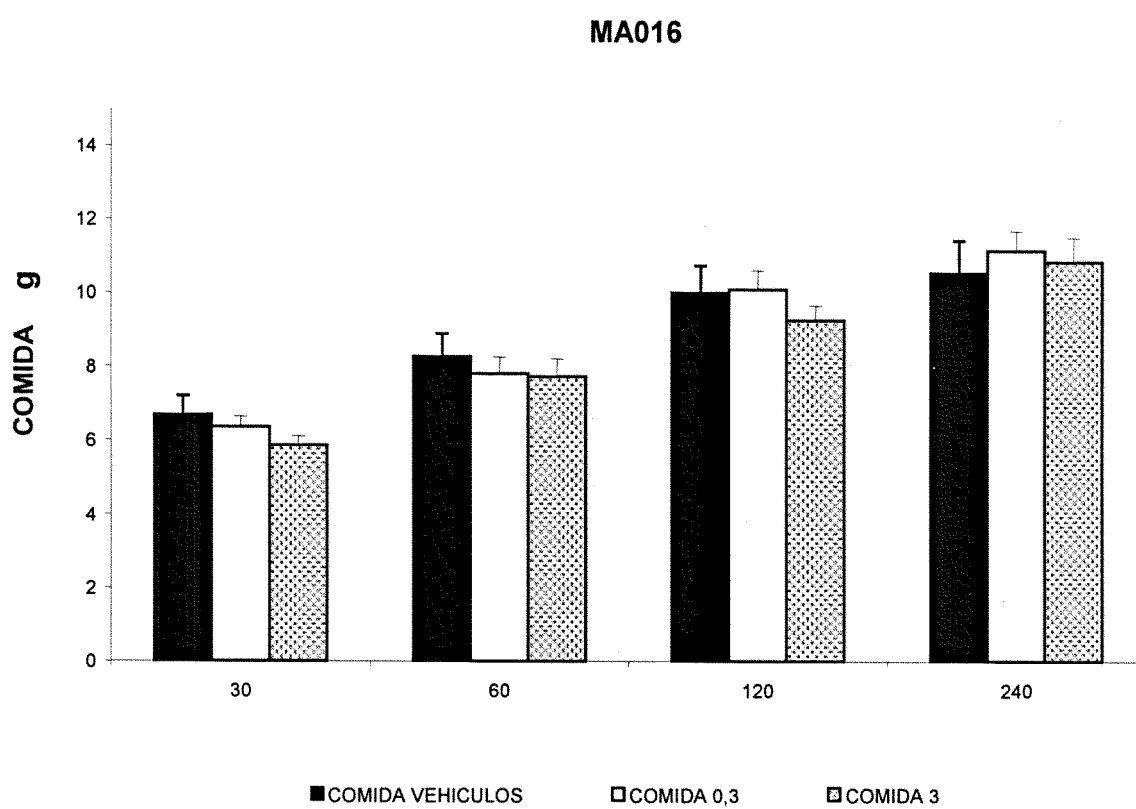


Figura 12

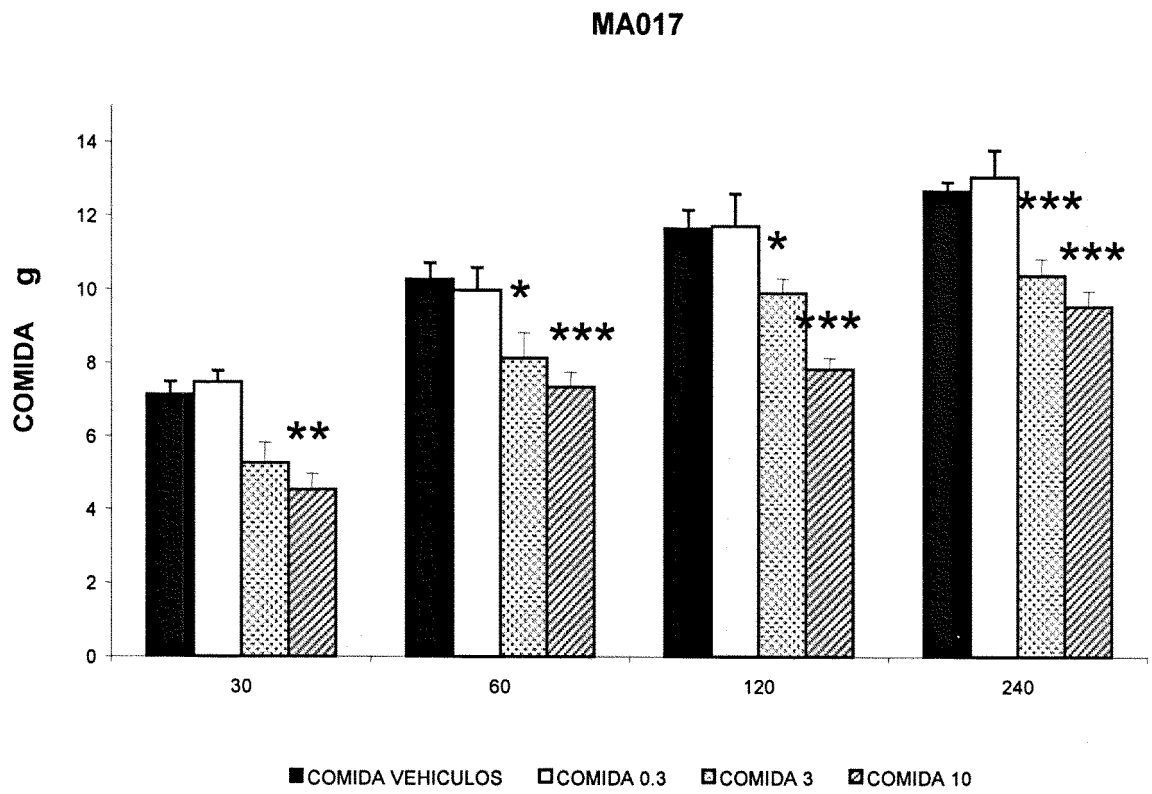


Figura 13



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 291 147

② Nº de solicitud: 200702691

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20030199536 A (THOMAS BRIAN T. y col.) 23.10.2003, reivindicaciones 1,9,11; página 9, tabla 4, compuestos BT-5,BT-3,BT-4.	1-14
A	US 6509367 A (MARTIN BILLY R. y col.) 21.01.2003, columnas 29,30; tabla 2, compuestos O-1269 y O-1270.	1-14
A	WILEY, J.L. y col. Novel pyrazole cannabinoids: insights into CB1 receptor recognition and activation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001, Vol. 296, Nº 3, páginas 1013-1022, ISSN 0022-3565. Página 1016, tabla 2.	1-14
P,A	WO 2007028849 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 15.03.2007, todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.12.2007

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 231/14 (2006.01)

A61K 31/4152 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)