

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 071**

51 Int. Cl.:

**C07C 59/84** (2006.01) **C07C 323/62** (2006.01)  
**C07C 59/88** (2006.01) **C07C 69/736** (2006.01)  
**C07C 59/90** (2006.01) **C07D 213/30** (2006.01)  
**C07C 251/48** (2006.01)  
**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**C07C 59/68** (2006.01)  
**C07C 323/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2007 E 07786798 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2046716**

54 Título: **Derivados sustituidos de 1,3-difenilpropano, preparados y utilizaciones**

30 Prioridad:

**21.06.2006 FR 0605540**

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

**13.12.2013**

73 Titular/es:

**GENFIT (100.0%)  
PARC EURASANTE LILLE METROPOLE 885,  
AVENUE EUGENE AVINEE  
59120 LOOS, FR**

72 Inventor/es:

**DELHOMEL, JEAN-FRANÇOIS;  
HANF, RÉMY y  
CAUMONT-BÉRTRAND, KARINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 434 071 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados sustituidos de 1,3-difenilpropano, preparados y utilidades

La presente invención se refiere a compuestos sustituidos derivados de 1,3-difenilpropano, a las composiciones farmacéuticas que los contienen así como a sus aplicaciones terapéuticas, en particular en los campos de la salud humana y animal.

Los inventores han demostrado, sorprendentemente, que los compuestos según la invención poseen de manera intrínseca propiedades agonistas de PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisomas).

Las moléculas descritas en la invención son pues de particular interés para tratar las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemias, aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, la hipertensión, las enfermedades inflamatorias (asma, etc.), las patologías neurodegenerativas (Alzheimer, etc.), los cánceres, etc., así como para permitir la disminución del riesgo global. Preferiblemente, los compuestos según la invención son útiles para el tratamiento de dislipidemias.

La diabetes, la obesidad y las dislipidemias (concentraciones altas de colesterol LDL y triglicéridos en el plasma, colesterol HDL bajo, etc.) forman parte de los factores de riesgo cardiovascular identificados claramente que predisponen a un individuo a desarrollar una patología cardiovascular (Mensah M., 2004). Estos factores de riesgo se añaden a los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida como el tabaquismo, la inactividad física y las dietas desequilibradas. Existe un efecto sinérgico entre estos diferentes factores: la presencia simultánea de varios de ellos llevó a un dramático empeoramiento del riesgo cardiovascular y conviene entonces hablar de riesgo global ("global risk") para las enfermedades cardiovasculares. El número de casos de dislipidemia alcanzó el 43,6% de la población en 2004 en los principales países desarrollados. El número de casos de diabetes, actualmente en claro aumento está siendo cada vez más importante en la epidemiología de las enfermedades cardiovasculares: el número de casos de diabetes se estima en 7,6% de la población para el año 2010 (Fox-Tucker J., 2005).

Según la Sociedad Internacional de Aterosclerosis (Sociedad Internacional de Aterosclerosis, 2003), las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en los países industrializados y están siendo cada vez más frecuentes en los países en vías de desarrollo. Estas enfermedades son principalmente las enfermedades coronarias, accidente cerebrovascular isquémico y las enfermedades arteriales periféricas.

Estos datos justifican pues la adopción de medidas enérgicas para reducir significativamente la morbilidad y la mortalidad cardiovasculares y la necesidad de encontrar tratamientos eficaces y complementarios a un cambio del estilo de vida, actuando sobre los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y sus consecuencias se convierten en una emergencia global.

Los compuestos según la invención, por sus propiedades agonistas de PPAR son de particular interés para el tratamiento de patologías relacionadas con los desajustes del metabolismo de los lípidos y/o hidratos de carbono, tales como la diabetes, la obesidad, las dislipidemias o la inflamación, así como para la reducción del riesgo cardiovascular global.

Los PPAR ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) son de hecho conocidos por estar involucrados en este tipo de enfermedades (Kota B.P. *et al.*, 2005): los ligandos de estos receptores se comercializan pues para el tratamiento de dichas enfermedades (Lefebvre P. *et al.*, 2006) y numerosos moduladores de PPAR, agonistas o antagonistas selectivos o no, se encuentran actualmente en desarrollo avanzado. Un modulador de PPAR con efectos beneficiosos sobre la resistencia a la insulina, la obesidad, las dislipidemias, la hipertensión y/o la inflamación podría ser utilizado en el tratamiento de síndrome metabólico (o síndrome X) (Liu Y. y Miller A., 2005).

La familia de los PPAR comprende tres isoformas, denominadas  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (todavía denominada  $\beta$ ), cada una codificado por un gen diferente. Estos receptores forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares y los factores de transcripción que se activan por la unión de ciertos ácidos grasos y/o sus metabolitos lipídicos. Los PPAR activados forman heterodímeros con los receptores del ácido 9-cis retinoico (RXR o receptor X retiniano) y se fijan a elementos de respuesta específicos (PPRE o Elemento de respuesta del proliferador de peroxisomas) en el activador de sus genes diana, lo que permite el control de la transcripción.

El PPAR controla el metabolismo de los lípidos (hepático y muscular) y la homeostasis de la glucosa, influye en el metabolismo intracelular de los lípidos y de los azúcares para un control directo de la transcripción de los genes que codifican proteínas implicadas en la homeostasis de los lípidos, ejerce efectos antiinflamatorios y antiproliferantes y evita los efectos proaterogénicos de la acumulación de colesterol en los macrófagos estimulando la salida de colesterol (Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.C. y Staels B., 2006). Los fibratos (fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrozilo), por medio de PPAR $\alpha$ , se utilizan así clínicamente en el tratamiento de determinadas dislipidemias reduciendo los triglicéridos y aumentando las concentraciones de colesterol HDL (High Density Lipoprotein).

El PPAR $\gamma$  es un regulador clave de la adipogénesis. Además, está implicado en el metabolismo lipídico de los adipocitos maduros, en la homeostasis de la glucosa, en particular en la resistencia a la insulina, en la inflamación,

en la acumulación de colesterol en los macrófagos y en la proliferación celular (Lehrke M. y Lazar M.A., 2005). Por consiguiente, PPAR $\gamma$  desempeña una función en la patogenia de la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes. Las tiazolidindionas (Rosiglitazona, Troglitazona, etc.) Son ligandos del receptor PPAR $\gamma$  utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

5 Hay ligandos de PPAR $\delta$  (L-165041, GW501516 actualmente en desarrollo clínico), pero ningún ligando de PPAR se utiliza actualmente como medicamento. Este receptor es sin embargo un objetivo atractivo para el desarrollo de medicamentos utilizados en el tratamiento de dislipidemias, la aterosclerosis, la obesidad y la resistencia a la insulina: PPAR $\delta$  está implicado en efecto en el control del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, en el balance de energía en la neurodegeneración, en la obesidad, en la formación de células espumosas y en la inflamación (Gross B. *et al.*, 2005).

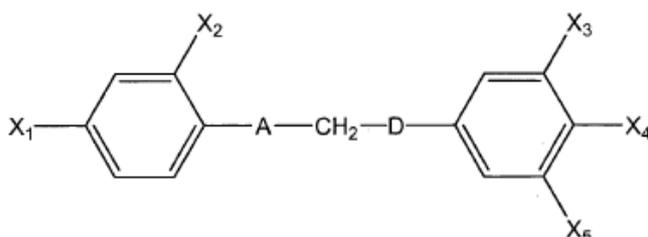
Más allá de la función directa desempeñada por los ligandos PPAR en la regulación del metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono, estas moléculas tienen un espectro de acción pleiotrópica debido a la gran diversidad de genes diana de los PPAR. Estas propiedades hacen de los PPAR múltiples dianas terapéuticas de interés para el tratamiento de enfermedades tales como aterosclerosis, accidente cerebrovascular isquémico, la hipertensión, las enfermedades relacionadas con la neovascularización (retinopatías diabéticas, etc.), las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerosis múltiple, asma, etc.), enfermedades neoplásicas (carcinogénia, etc.), las enfermedades neurodegenerativas, las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, resistencia a la insulina, la diabetes, las dislipidemias, enfermedad cardiovascular, la obesidad, etc., así como para permitir la reducción del riesgo general.

20 Los compuestos según la invención, por sus propiedades agonistas PPAR, representan por lo tanto una herramienta terapéutica atractiva para la mejora de patologías relacionadas con los trastornos del metabolismo de lípidos y/o de los hidratos de carbono, principalmente las dislipidemias, así como para la reducción del riesgo cardiovascular general.

Más en general, actuando simultáneamente sobre varios procesos de regulación, los compuestos según la invención representan una herramienta terapéutica beneficiosa para el tratamiento de complicaciones asociadas al síndrome metabólico (cuyas características son la obesidad, especialmente la obesidad abdominal, una concentración anormal de lípidos en la sangre (elevada concentración de triglicéridos y/o baja concentración de colesterol HDL (dislipidemia)), una glucemia elevada y/o una resistencia a la insulina e hipertensión), la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, la resistencia a la insulina, la obesidad, la hipertensión, la diabetes, las dislipidemias, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades inflamatorias (asma, etc.), las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, etc.), los cánceres, etc. y para permitir la reducción del riesgo general.

Morishita *et al.*: «Synthesis and hypolipidaemic activity of 2-substituted isobutyric acid derivatives» *Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society*. Washington, US, vol. 31, no. 6, Junio de 1988 (1988-06), páginas 1205-1209 da a conocer compuestos hipolipidémicos, diferentes de la presente invención. Los documentos DE 41 21 849 y Labaudinière R. *et al.* (*Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, Washington, Estados Unidos*, vol. 35, nº 17, 1992, páginas 3156-3169) describen inhibidores de la hidrolasa de leucotrieno A4 en el tratamiento de la inflamación crónica como el tratamiento de reumatismo, psoriasis y otras enfermedades de la piel, pero los compuestos descritos son diferentes a los de la presente invención. Está además el documento DE 46 27 365 que da a conocer compuestos fenólicos y derivados fenólicos como agentes que disminuyen la concentración de fibrinógeno en el plasma.

La presente invención se refiere a compuestos derivados de 1,3-difenilpropano sustituidos de fórmula general (I) siguiente:



(I)

en la que:

45 X1 representa un átomo de halógeno, un grupo R1 o G1-R1;

X2 representa un átomo de hidrógeno;

- X3 representa un grupo R3;
- X4 representa G4-R4 en el que G4 representa un átomo de oxígeno;
- X5 representa un grupo R5;
- representando R1 un grupo alquilo halogenado;
- 5 representando R2 un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo;
- representando R3 y R5, idénticos o diferentes, un grupo alquilo no sustituido;
- representando R4 un grupo alquilo sustituido por un grupo COOR9;
- representando G1 un átomo de oxígeno o de azufre;
- A representa:
- 10 (i) un grupo-CR6R7 en el que:
- R6 representa un átomo de hidrógeno,
- y R7 representa un grupo hidroxilo o un grupo -OR8, siendo R8 tal como se define a continuación,
- (ii) un grupo carbonilo (CO),
- representando R8 un grupo alquilo, sustituido o no por un grupo arilo o cicloalquilo;
- 15 D representa un átomo de carbono unido a dos átomos de hidrógeno (CH<sub>2</sub>),
- representando R9 un átomo de hidrógeno o un radical alquilo no sustituido;
- sus estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros), puros o en mezcla, mezclas racémicas, isómeros geométricos, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, formas sólidas así como sus mezclas.
- 20 En el contexto de la presente invención, el término "alquilo" designa un radical hidrocarbonado saturado, lineal, ramificado o cíclico, halogenado o no, teniendo más en particular de 1 a 24, preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono. Se pueden citar, por ejemplo, los radicales metilo, trifluorometilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, pentilo, neopentilo, n-hexilo o ciclohexilo.
- 25 El término "cicloalquilo" designa un grupo alquilo tal como se ha definido anteriormente y formando al menos un ciclo. Se puede mencionar al respecto grupos cicloalquilo con 3 a 8 átomos de carbono, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.
- El término "alquilo" se refiere a una cadena de alquilo unida a la molécula mediante un átomo de oxígeno (enlace éter). La cadena de alquilo responde a la definición mencionada anteriormente. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los grupos metoxi, trifluorometoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, iso-butoxi, terc-butoxi, sec-butoxi o hexiloxi.
- 30 El término "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen preferentemente 5 a 14 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 14 átomos de carbono, opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O, S o P (más específicamente denominado "heteroarilo"). Por lo general son mono- o bi-cíclicos y comprenden preferentemente de 6 a 14 átomos de carbono, tales como fenilo,  $\alpha$ -naftilo,  $\beta$ -naftilo, antraceno o fluoreno.
- 35 La expresión "heterociclo oxigenado o azufre" designa un grupo cicloalquilo tal como se ha definido anteriormente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados entre O y S. Se puede citar como ejemplo el tiopirano o el pirano.
- Por átomo de halógeno se entiende un átomo de bromo, cloro, flúor o yodo.
- 40 Un radical alquilo halogenado es un radical alquilo tal como se definió anteriormente, que presenta al menos un átomo de halógeno, o está totalmente halogenado (perhalogenado).
- Un aspecto particular de la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) en la que A representa un grupo carbonilo (CO).
- Otro aspecto concreto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) en la que A representa un grupo -CR6R7, representando R6 un átomo de hidrógeno y representando R7 un grupo hidroxilo.

5 Otro aspecto preferido de la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) en la que A representa un grupo -CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, representando R<sub>6</sub> un átomo de hidrógeno y representando R<sub>7</sub> un grupo -OR<sub>8</sub>, siendo R<sub>8</sub> tal como se definió anteriormente. En particular, R<sub>8</sub> representa un grupo alquilo que comprende preferentemente 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono. Aún más preferentemente, R<sub>8</sub> representa un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo o cicloalquilo, dicho grupo arilo o cicloalquilo constan en particular de 6 átomos de carbono.

Otro objeto particular de la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) en la que X<sub>3</sub> y X<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan respectivamente un grupo R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub>, representando R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, un grupo alquilo no sustituido.

10 Preferiblemente, X<sub>3</sub> y X<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un grupo R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub>, representando R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, un grupo alquilo no sustituido, que tiene preferentemente 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono. Aún más preferentemente, X<sub>3</sub> y X<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un grupo metilo.

Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) en la que X<sub>4</sub> representan un grupo G<sub>4</sub>-R<sub>4</sub>, siendo G<sub>4</sub> tal como se definió anteriormente, y

15 representando R<sub>4</sub> representa un grupo alquilo sustituido por un grupo COOR<sub>9</sub>, en especial por COOH. Aún más preferentemente, X<sub>4</sub> representa un grupo -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOH o -OCH<sub>2</sub>COOH.

Un aspecto determinado de la invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) en el cual R<sub>9</sub> representa preferentemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

20 Un aspecto determinado de la invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) en la que X<sub>4</sub> responde a la fórmula -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOR<sub>9</sub>, siendo R<sub>9</sub> como se definió anteriormente y representando preferentemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

Un objeto determinado de la invención refiere a los compuestos de fórmula general (I) en la que X<sub>1</sub> representa un grupo R<sub>1</sub> o G<sub>1</sub>R<sub>1</sub>.

siendo G<sub>1</sub> tal como se definió anteriormente, y

representando R<sub>1</sub> un grupo alquilo halogenado.

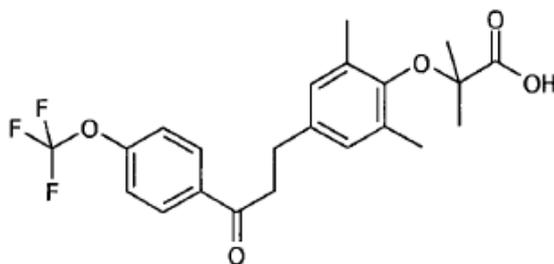
25 Preferentemente, R<sub>1</sub> es un grupo alquilo halogenado con 1, 2 o 3 átomos de carbono.

Aún más preferentemente X<sub>1</sub> representa un grupo -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -CFS<sub>3</sub>, -ORCF<sub>3</sub>, R representa un grupo alquilo tal como el definido anteriormente.

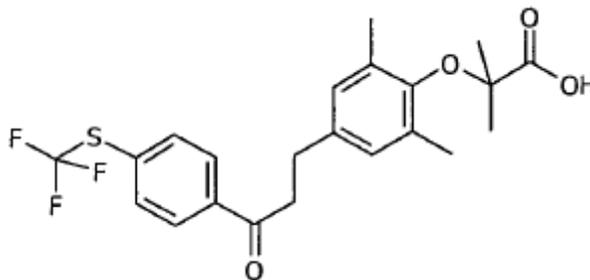
Un objeto determinado de la invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) en la que X<sub>1</sub> representa un átomo de halógeno (bromo, cloro, flúor, yodo). Preferentemente, X<sub>1</sub> representa un átomo de cloro o bromo.

30 Los compuestos que forma parte de la presente invención, así como los compuestos comparativos se indican a continuación:

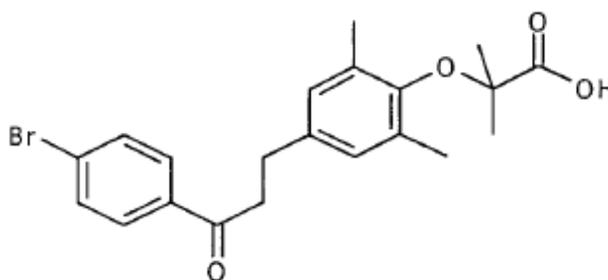
Compuesto 1: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiloxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



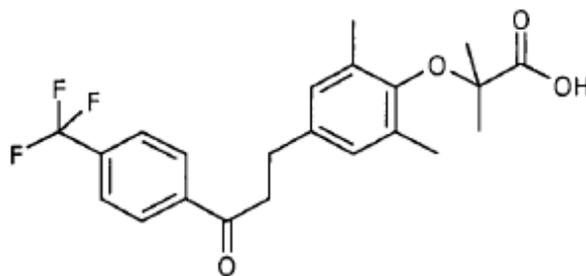
Compuesto 2: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



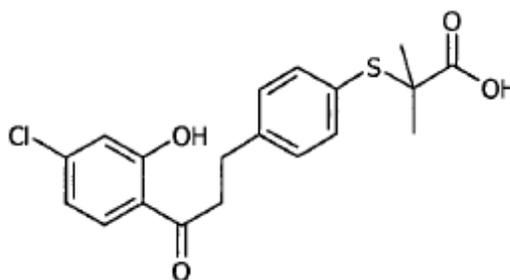
Compuesto 3: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



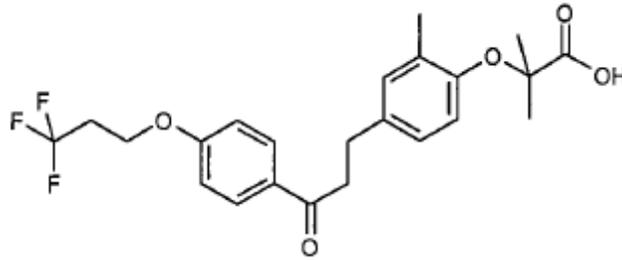
5 Compuesto 4: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



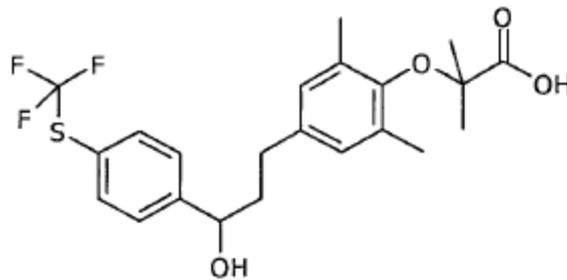
Compuesto 5 comparativo: Ácido 2-[4-[3-[4-cloro-2-hidroxifenil]-3-oxo-propil]feniltio]-2-metilpropanoico



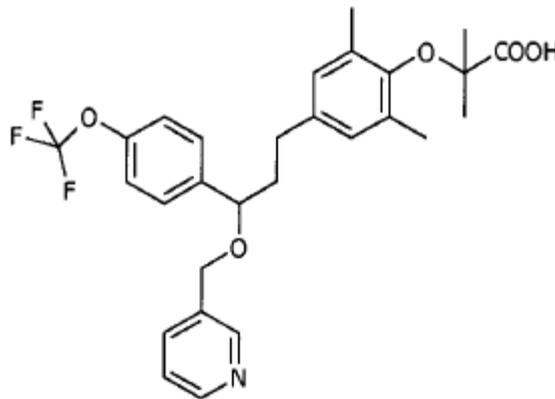
Compuesto 6: Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



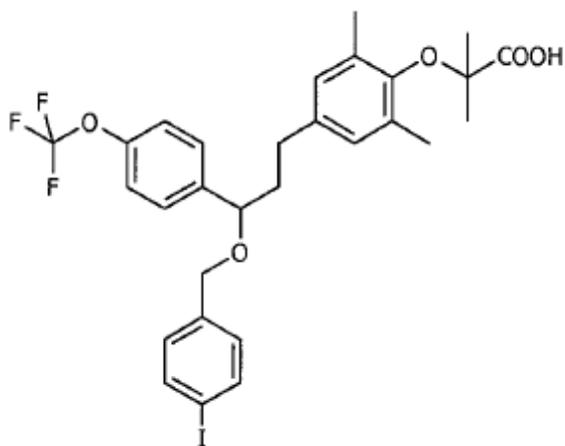
Compuesto 7: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-hidroxi-3-[4-(trifluorometiltilio)fenil]propil]fenoxi]-2-metilpropanoico



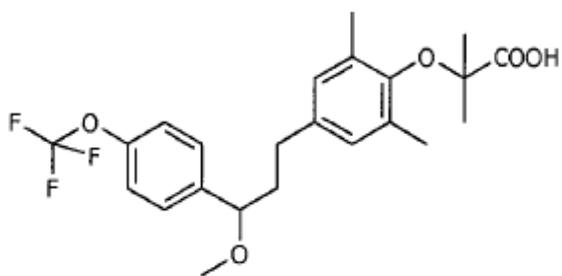
5 Compuesto 8: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-(3-(piridin-3-ilmetoxi)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi]-2-metilpropanoico



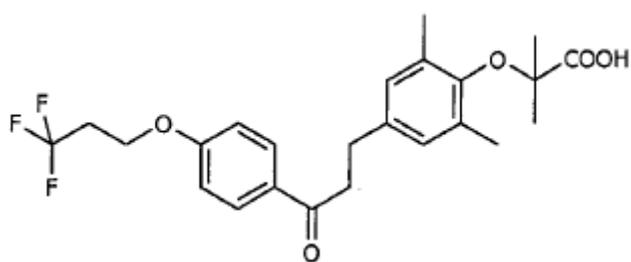
Compuesto 9: Ácido 2-[4-(3-(4-yodobenciloxi)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi]-2-metilpropanoico



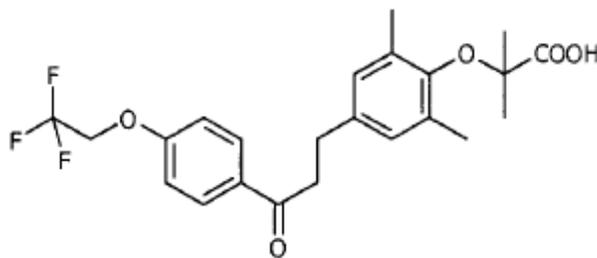
Compuesto 10: Ácido 2-[4-(3-metoxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi]-2-metilpropanoico



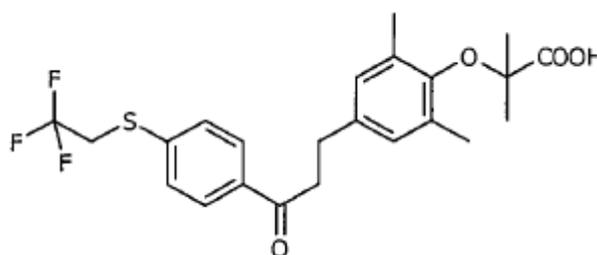
5 Compuesto 11: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico



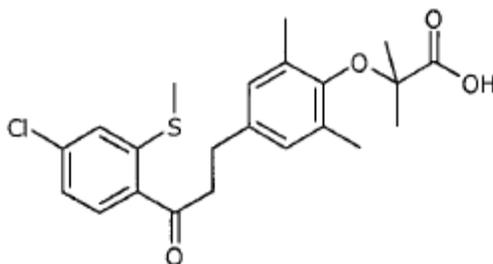
Compuesto 12: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico



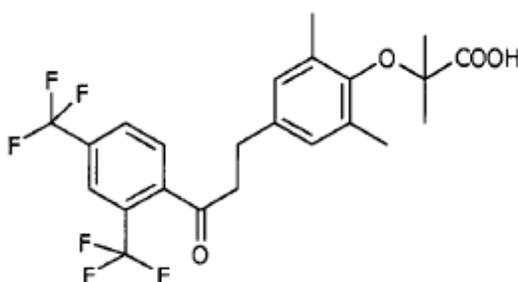
Compuesto 13: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetiltilio)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico



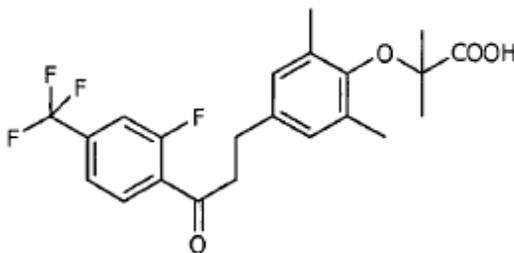
5 Compuesto 14 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(4-cloro-2-(metiltio)fenil)-3-oxopropil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



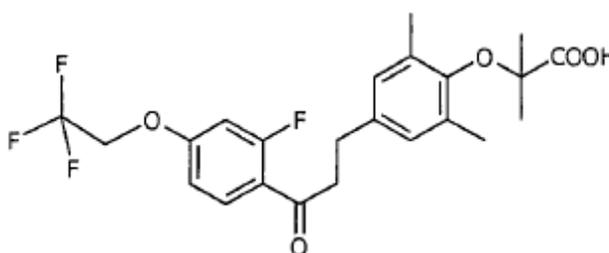
Compuesto 15 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2,4-bis (trifluorometil)fenil)-3-oxopropil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



Compuesto 16: Ácido 2-(4-(3-(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxopropil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico

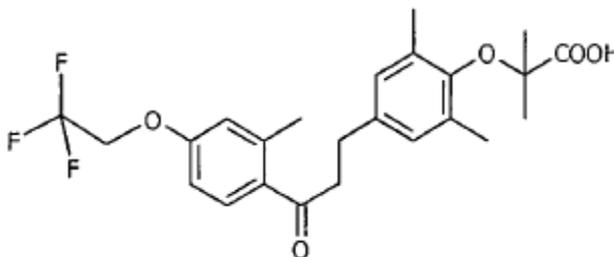


Compuesto 17 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-fluoro-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-3-oxo-propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



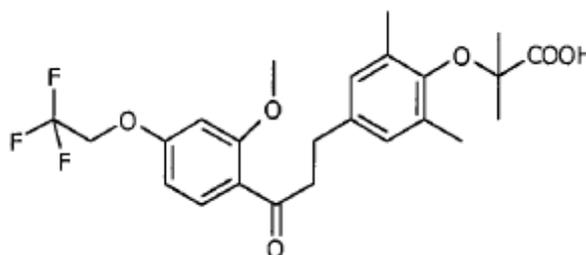
5

Compuesto 18 comparativo: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-(2-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-3-oxo-propil)fenoxi)-2-metilpropanoico

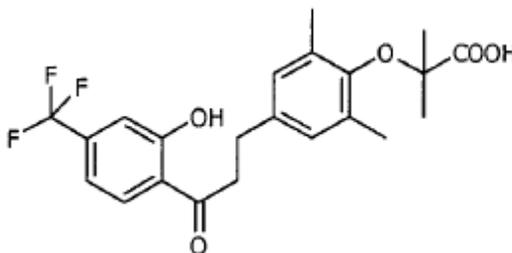


10

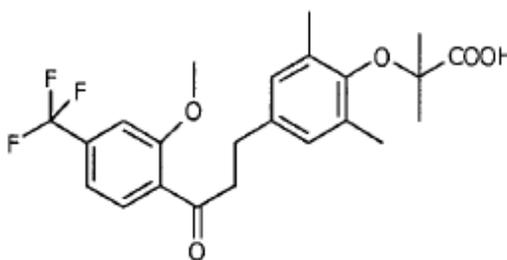
Compuesto 19 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-metoxi-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-3-oxo-propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



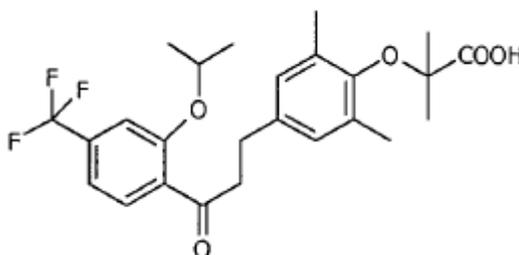
Compuesto 20 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-hidroxi-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxo-propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



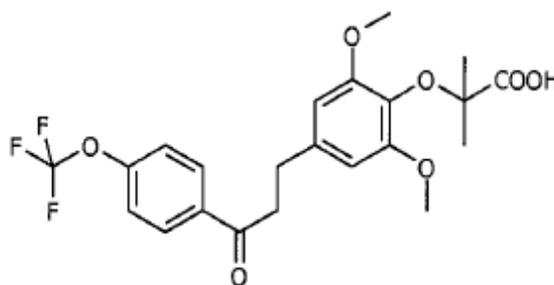
5 Compuesto 21 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-metoxi-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxo-propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



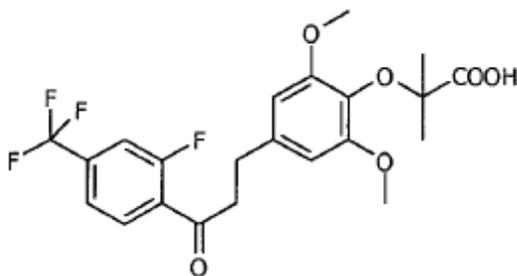
Compuesto 22 comparativo: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-(2-isopropiloxi-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxo-propil)fenoxi)-2-metilpropanoico



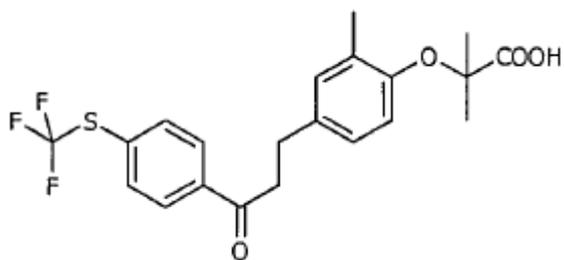
10 Compuesto 23: Ácido 2-(2,6-dimetoxi-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico



Compuesto 24 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxopropil)-2,6-dimetoxi-fenoxi)-2-metilpropanoico

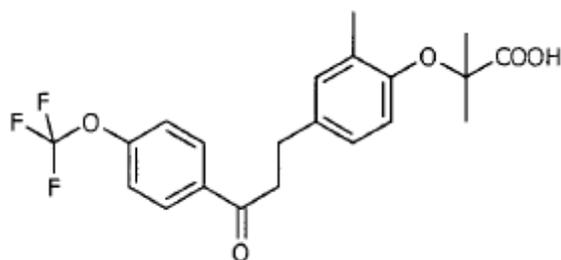


Compuesto 25: Ácido 2-metil-2-(2-metil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometil)io)fenil)propil)fenoxi)propanoico

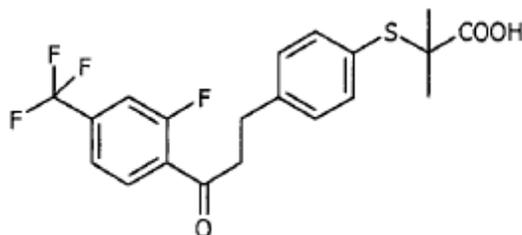


5

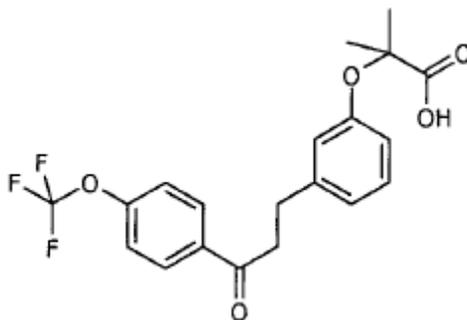
Compuesto 26: Ácido 2-metil-2-(2-metil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)propanoico



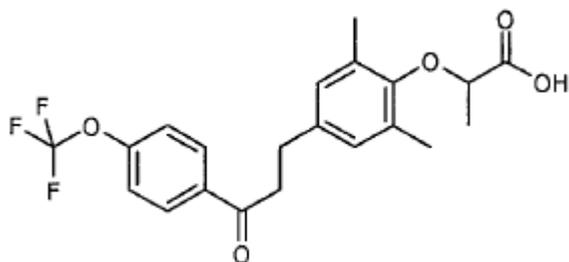
Compuesto 27 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)-3-oxo-propil)feniltio)-2-metilpropanoico



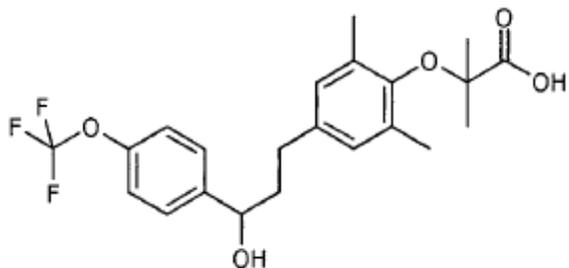
Compuesto 28: Ácido 2-metil-2-(3-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)propanoico



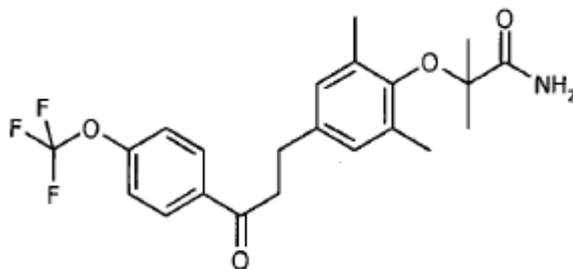
Compuesto 29: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)propanoico



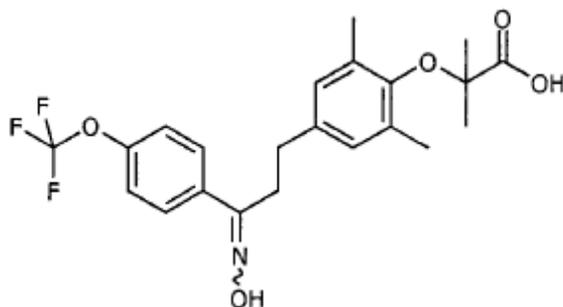
5 Compuesto 30: Ácido 2-(4-(3-hidroxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



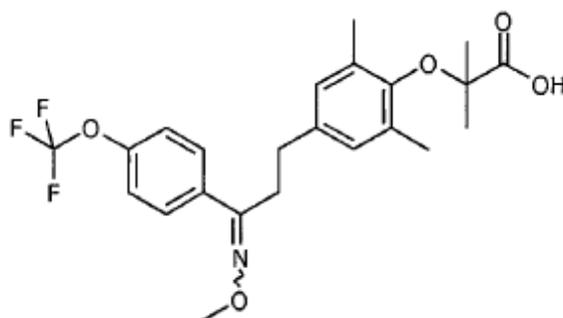
Compuesto 31: 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanamida



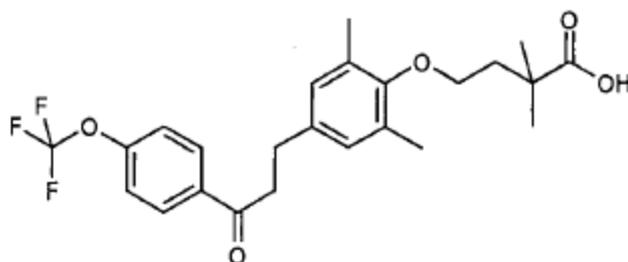
Compuesto 32 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(hidroxiimino)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



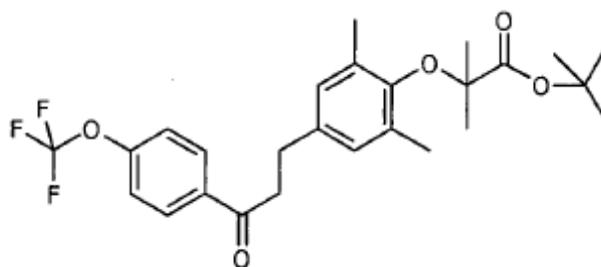
5 Compuesto 33 comparativo: Ácido 2-(4-(3-(metoxi)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



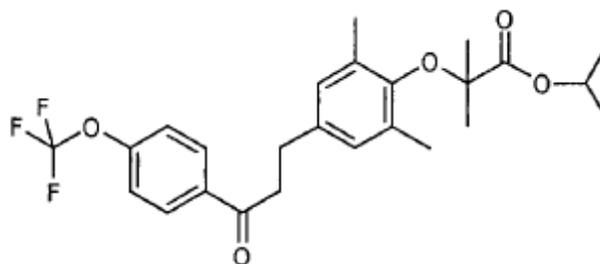
Compuesto 34: Ácido 4-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoico



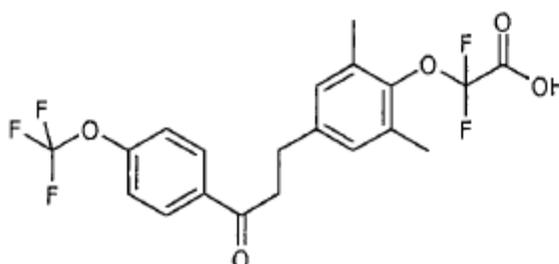
Compuesto 35: 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoato de terc-butilo



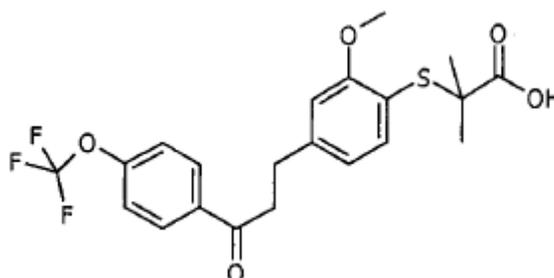
Compuesto 36: 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoato de isopropilo



Compuesto 37: Ácido 2,2-difluoro-2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)acético



5 Compuesto 38: Ácido 2-(2-metoxi-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)feniltio)-2-metilpropanoico



Los compuestos preferidos de la presente invención son los citados en la reivindicación 7. La invención se refiere aún más preferentemente a los siguientes compuestos:

- Compuesto 1: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico;
- 10 Compuesto 2: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiltio)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico;
- Compuesto 3: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico;
- Compuesto 4: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico;
- Compuesto 11: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico;
- Compuesto 36: 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoato de isopropilo.

15 Los compuestos de la presente invención incluyen sus estereoisómeros (diastereoisómeros y enantiómeros), puros o en mezcla, sus mezclas racémicas, sus isómeros geométricos, sus tautómeros, sus sales, sus hidratos, sus solvatos, sus formas sólidas así como sus mezclas.

20 Los compuestos según la invención pueden contener uno o más centros asimétricos. La presente invención incluye los estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros), puros o mezclados, así como las mezclas racémicas y los isómeros geométricos. Cuando se desea una mezcla enantioméricamente pura (o enriquecida), se puede obtener ya

sea por purificación del producto final o de los productos intermedios quirales, o mediante síntesis asimétrica siguiendo los métodos conocidos por los expertos en la técnica (utilizando por ejemplo reactivos y catalizadores quirales). Determinados compuestos según la invención pueden tener diferentes formas tautómeras estables y todas estas formas así como sus mezclas están incluidas en la invención.

5 La presente invención también se refiere a las sales "farmacéuticamente aceptables" de los compuestos según la invención. En general, esta expresión se refiere a sales poco o no tóxicas obtenidas a partir de bases o ácidos, orgánicos o inorgánicos. Estas sales pueden obtenerse durante la etapa de purificación final del compuesto según la invención o mediante la incorporación de la sal en el compuesto ya purificado.

10 Determinados compuestos de la invención y sus sales pueden ser estables en varias formas sólidas. La presente invención incluye todas las formas sólidas de los compuestos de la invención lo que incluye las formas amorfas, polimorfas, mono- y poli-cristalinas.

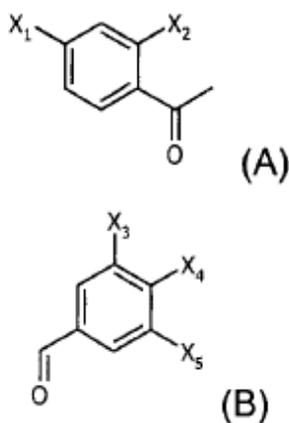
Los compuestos según la invención pueden existir en forma libre o en forma solvatada, por ejemplo, con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua (hidratos) o etanol.

15 Los compuestos según la invención marcado por uno o más isótopos también están incluidos en la invención: estos compuestos son estructuralmente idénticos, pero difieren en que por el hecho de que al menos un átomo de la estructura se sustituye con un isótopo (radiactivo o no). Ejemplos de isótopos que pueden estar incluidos en la estructura de los compuestos de la invención pueden seleccionarse entre hidrógeno, carbono, oxígeno, azufre, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{S}$ ,  $^{35}\text{S}$ , respectivamente. Los isótopos radiactivos  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  son especialmente preferidos por que son fáciles de preparar y detectar en el contexto de los estudios de biodisponibilidad *in vivo* de las sustancias. Los isótopos pesados (tales como  $^2\text{H}$ ) son particularmente preferidos por que se utilizan como patrones internos en estudios analíticos.

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula general (I) tal como se definió anteriormente.

El procedimiento de la presente invención comprende:

25 - una etapa de puesta en contacto (i) en medio básico o en medio ácido de al menos un compuesto de fórmula (A) con al menos un compuesto de fórmula (B):



en las que X1, X2, X3, X4 y X5 tienen los significados dados anteriormente, después,

- (ii) una etapa de reducción de los compuestos así obtenidos,

30 - y, opcionalmente, (iii) una etapa de inserción de grupos funcionales.

Las condiciones para la puesta en práctica de la etapa (i) en medio ácido o básico y de la etapa (ii) están al alcance de los expertos en la técnica y pueden variar en gran medida. Los protocolos de síntesis pueden ser en particular los presentados en el apartado "ejemplos" de la presente invención.

35 La puesta en contacto de estos dos compuestos se lleva a cabo ventajosamente de manera estequiométrica. Se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente (entre alrededor de  $18^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$ ) y a presión atmosférica.

En medio básico básicas, la reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia de una base fuerte, tal como un hidróxido de metal alcalino, como hidróxido sódico o un alcóxido de metal alcalino tal como etóxido de sodio.

En medio ácido, la reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia de un ácido fuerte, tal como ácido clorhídrico.

Los compuestos así obtenidos pueden ser aislados por métodos convencionales y conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar a continuación principalmente como medicamentos o cosméticos.

- 5 La presente invención también tiene por objeto los compuestos tales como los descritos anteriormente, como medicamentos.

La presente invención tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica que comprende, en un soporte aceptable en el plano farmacéutico, al menos un compuesto tal como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en combinación con uno o varios otros principios activos terapéuticos y/o cosméticos.

- 10 Se trata preferentemente de una composición farmacéutica para tratar los factores de riesgo cardiovasculares relacionados con trastornos del metabolismo de los lípidos y/o carbohidratos (hiperlipidemia, diabetes de tipo II, obesidad etc.) permitiendo con ello la reducción del riesgo global.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición nutritiva que comprende al menos un compuesto como se describió anteriormente.

- 15 Otro objeto de la invención radica en la utilización de al menos un compuesto como el descrito anteriormente para la preparación de las composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de diversas patologías, principalmente relacionadas con trastornos del metabolismo entre las que se puede citar las dislipidemias. Más generalmente, la invención tiene por objeto la utilización de al menos un compuesto tal como se describe anteriormente para la preparación de las composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de los factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares relacionadas con trastornos del metabolismo de los lípidos y/o de los carbohidratos y a reducir el riesgo general.
- 20 y a reducir el riesgo general.

A título de ejemplo (y sin limitación), los compuestos según la invención podrán de manera ventajosa administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos y/o cosméticos, comercializados o en desarrollo, tales como:

- 25
- los antidiabéticos: insulinosecretores (sulfonilureas (glibenclamida, glimepirida, gliclazida, etc.) y glinidas (repaglinida, nateglinida, etc.)), los inhibidores de la alfa-glucosidasa, agonistas PPARy (tiazolidindionas tales como rosiglitazona, pioglitazona), los agonistas mixtos PPARα/PPARy (tesaglitazar, muraglitazar), los pan-PPAR (compuestos que activan simultáneamente las 3 isoformas PPAR), las biguanidas (metformina), inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (MK-431, vildagliptina), los agonistas del Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) (exenatida), etc.
- 30
- la insulina
  - moléculas hipolipemiantes o hipocolesterolemiantes: los fibratos (fenofibrato, gemfibrozil) inhibidores de la HMG CoA reductasa o hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (estatinas como la atorvastatina, simvastatina, fluvastatina), (ezetimiba, fitoesteros), inhibidores de la CETP o Cholesterol Ester Transfer Protein (torcetrapib), inhibidores de la ACAT o Acyl-Coenzyme A cholesterol acylTransferase (Avasimiba, Eflucimiba), inhibidores de MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), los agentes secuestrantes de los ácidos biliares (colestiramina), la vitamina E, los ácidos grasos poliinsaturados, los ácidos grasos omega-3, los derivados de tipo ácido nicotínico (niacina), etc.
- 35
- agentes antihipertensores y agentes hipotensores: los inhibidores ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) (captopril, enalapril, ramipril o quinapril), los antagonistas del receptor de la angiotensina II (losartán, valsartán, telmisartan, eposartan, irbesartán, etc.), los betabloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol), los diuréticos tiazídicos y no tiazídicos (furosemida, indapamida, hidroclorotiazida y amlodipina, diltiazem o verapamilo), etc.
- 40
- agentes antiplaquetarios: Aspirina, Ticlopidina, Dipyridamol, Clopidogrel, flurbiprofeno, etc.
- 45
- fármacos contra la obesidad: Sibutramina, los inhibidores de las lipasas (orlistat), los agonistas y antagonistas PPARδ, los antagonistas del receptor canabinoide CB1 (rimonabant), etc.
  - agentes antiinflamatorios: por ejemplo, los corticoides (prednisona, betametasona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, hidrocortisona, etc.), los AINS o antiinflamatorios no esteroideos anti-inflamatorios no esteroideos derivados del indol (indometacina, sulindac), los AINS del grupo de los arilcarboxílicos (ácido tiaprofénico, diclofenac, etodolac, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, nabumetona, alminoprofeno), los AINS derivados del oxicam (meloxicam, piroxicam, tenoxicam), los AINS del grupo de los fenamatos, los inhibidores selectivos de la COX2 (celecoxib, rofecoxib), etc.
- 50
- agentes antioxidantes: por ejemplo el probucol, etc.

- agentes utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca: los diuréticos tiazídicos o no tiazídicos (furosemida, indapamida, hidroclorotiazida, anti-aldosterona), los inhibidores del ACE (captopril, enalapril, ramipril o quinapril), los digitálicos (digoxina, digitoxina), los beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol) los inhibidores de fosfodiesterasas (enoximone, milrinona), etc.
- 5      – agentes utilizados para el tratamiento de la insuficiencia coronaria: los beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol), los bloqueadores de los canales del calcio (nifedipina, felodipina o amlodipina, bepridilo, diltiazem o verapamilo), los agentes donantes de NO (trinitrina, dinitrato de isosorbida, molsidomina), la Amiodarona, etc.
- 10     – anticancerígenos: los agentes citotóxicos (agentes interactuantes con el ADN, agentes alquilantes, cisplatino y derivados), los agentes citostáticos (análogos de GnRH( Gonatropin-Realising Hormone), los análogos de la somatostatina, los progestágenos, los antiestrógenos, los inhibidores de la aromatasas, etc.), los moduladores de la respuesta inmunitaria (interferones, IL2, etc.), etc.
- antiasmáticos tales como los broncodilatadores (agonistas de receptores beta 2), corticoides, el cromoglicato, los antagonistas del receptor de leucotrienos (montelukast), etc.
- 15     – corticoides utilizados en el tratamiento de enfermedades de la piel tales como la psoriasis y las dermatitis
- vasodilatadores y/o agentes antiisquémicos (buflomedilo, extracto de Ginkgo Biloba, naftidrofurilo, pentoxifilina, piribedilo), etc.

20     La invención también se refiere a un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de los lípidos y/o hidratos de carbono que comprende la administración a un sujeto, especialmente el ser humano, de una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica según se ha definido anteriormente. A los efectos de la invención, el término "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto suficiente para producir el resultado biológico deseado. A los efectos de esta invención, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, especialmente un ser humano.

25     El término "tratamiento", designa el tratamiento curativo, sintomático o preventivo. Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar así en sujetos (tales como mamíferos, en particular en seres humanos) que padecen una enfermedad declarada. Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse para retrasar o retardar la evolución o evitar una evolución más adelante de la enfermedad, mejorando así el estado de los sujetos. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por último, a sujetos no enfermos, pero que podrían desarrollar normalmente la enfermedad o que tienen un riesgo importante de desarrollar la enfermedad.

30     Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden preferentemente uno o más excipientes o vehículos, farmacéuticamente aceptables. Se puede citar, por ejemplo, soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc., compatibles con un uso farmacéutico y conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones pueden contener uno o varios agentes seleccionados entre los dispersantes, disolventes, estabilizantes, conservantes, etc. Agentes o vehículos utilizados en las formulaciones (líquidos y/o inyectables y/o sólidos) son especialmente la metil-celulosa, la hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, 35     gelatina, lactosa, aceites vegetales, goma arábiga, liposomas, etc. Las composiciones pueden formularse en forma de suspensiones inyectables, geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente por medio de formas galénicas o dispositivos que proporcionan una liberación sostenida y/o retardada. Para este tipo de formulación, se utiliza preferentemente un agente tal como la celulosa, carbonatos o 40     almidones.

Los compuestos o composiciones de la invención se pueden administrar de diferentes maneras y en diferentes formas. Así, pueden administrarse por ejemplo, de manera general, por vía oral, parenteral, por inhalación o por inyección, como por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarterial, etc. Para 45     las inyecciones, los compuestos están generalmente acondicionados en forma de suspensiones líquidas, que pueden inyectarse mediante jeringas o infusiones, por ejemplo.

Se entiende que el caudal y/o la dosis inyectada pueden ser adaptados por los expertos en la técnica en función del paciente, de la enfermedad, de la vía de administración, etc. Por lo general, los compuestos se administran en dosis que pueden variar entre 1 µg y 2 g por dosis, preferentemente de 0,1 mg a 1 g por dosis. Las administraciones pueden ser diarias, es decir repetidas varias veces al día, si es necesario. Por otra parte, las composiciones según la 50     invención pueden comprender, además, otros agentes o principios activos.

#### **Leyendas de las figuras**

Abreviaturas empleadas en las figuras:

- Cpd = compuesto

- Ctrl = referencia
- mpk = mg/kg/día
- colesterol LDL = colesterol lipoproteína de baja densidad
- colesterol HDL = colesterol lipoproteína de alta densidad
- 5 - colesterol VLDL = colesterol lipoproteína de muy baja densidad

Figuras 1-1 a 1-18: Evaluación *in vitro* de propiedades de activación de los PPAR de los compuestos según la invención en función de la dosis

10 La activación de los PPAR se evalúa *in vitro* en una línea de fibroblastos de riñón de mono (COS-7), mediante la determinación de la actividad de transcripción de híbridos constituidos del dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 de la levadura y del dominio de enlace al ligando de diferentes PPAR.

Los compuestos se ensayaron a dosis comprendidas entre  $10^{-7}$  y  $100 \mu\text{M}$  en los híbridos Gal4-PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . El factor de inducción, es decir la relación entre la luminiscencia inducida por el compuesto y la luminiscencia inducida por la referencia se mide para cada condición. Cuanto más elevado es el factor de inducción, más carácter activador de PPAR tiene el compuesto.

- 15 - Figuras 1-1, 1-2, 1-3: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 1
- Figuras 1-4, 1-5, 1-6: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 2
- Figuras 1-7, 1-8, 1-9: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 3
- Figuras 1-10, 1-11, 1-12: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 4
- Figuras 1-13, 1-14, 1-15: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 5
- 20 - Figuras 1-16, 1-17, 1-18: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del compuesto 7

Figuras 2-1 a 2-7: Evaluación *in vivo*, en ratones ApoE2/E2, propiedades sobre el peso corporal, de las propiedades hipolipemiantes y de las propiedades estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de compuestos según la invención

25 El efecto de los compuestos según la invención se evalúa *in vivo* en ratones humanizados para la isoforma E2 de la apolipoproteína E (E2/E2).

Se midió el peso corporal y se determinaron las concentraciones de colesterol total, de colesterol HDL, de triglicéridos y ácidos grasos libres en el plasma en ratones dislipidémicos E2/E2 después de 8 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención. Estos parámetros se comparan con los obtenidos con los animales de referencia (no tratados con los compuestos según la invención): la diferencia medida demuestra el efecto sobre el peso corporal y el efecto hipolipidémico de los compuestos según la invención

- 30 - Figura 2-1: Ganancia de peso corporal después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk
- Figura 2-2: Concentración de colesterol en el plasma después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk;
- 35 - Figura 2-3: Concentración de colesterol HDL en el plasma después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk
- Figura 2-4: Concentración de triglicéridos en el plasma después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk.
- 40 - Figura 2-5: Concentración de ácidos grasos libres en el plasma después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk.

45 La eficacia de los compuestos según la invención se evalúa también por determinación, en el tejido hepático, de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y/o de los hidratos de carbono y la disipación de la energía. Los niveles de expresión de cada gen se normalizan con relación al nivel de expresión del gen de referencia 36B4. Se calcula a continuación el factor de inducción, es decir la relación entre la señal relativa (inducida por el compuesto según la invención) y la media de los valores relativos del grupo de referencia. Cuanto más alto sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa como la media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

- Figura 2-6: Expresión de PDK4 (piruvato deshidrogenasa cinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en ratones E2/E2 después de 8 días de tratamiento con compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk
- Figura 2-7: Expresión de la ApoCIII (apolipoproteína C3) en el tejido hepático, en ratones E2/E2 después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 5, 10 y 50 mpk

5 Figuras 3-1 a 3-5: Evaluación *in vivo*, en ratones C57Bl6, de las propiedades sobre el peso corporal, propiedades hipolipemiantes y estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de compuestos según la invención.

Se evalúa *in vivo* el efecto de los compuestos según la invención en ratones C57Bl6 mediante la medición de la evolución del peso corporal, la determinación de las concentraciones de colesterol HDL y triglicéridos en el plasma después de 14 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención. Estos parámetros se comparan con los obtenidos con los animales de referencia (no tratados con los compuestos según la invención): la diferencia medida demuestra el efecto sobre el peso corporal y el efecto hipolipidémico de los compuestos según la invención.

- 10 - Figura 3-1: Ganancia de peso corporal después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 3, 10 y 30 mpk
- 15 - Figura 3-2: Concentración de colesterol HDL en el plasma después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 3, 10 y 30 mpk
- Figura 3-3: Concentración de triglicéridos en el plasma después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 3, 10 y 30 mpk

20 La eficacia de los compuestos según la invención se evalúa también mediante la determinación, en el tejido hepático de la expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico. Los niveles de expresión de cada gen se normalizan con relación al nivel de expresión del gen de referencia 36B4. Después se calcula el factor de inducción. Cuanto más alto sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa como media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

- 25 - Figura 3-4: Expresión de PDK4 (piruvato deshidrogenasa cinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en ratones C57Bl6 después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 3, 10 y 30 mpk
- Figura 3-5: Expresión de ApoCIII (apolipoproteína C3) en el tejido hepático, en ratones C57Bl6 después de 14 días de tratamiento con compuesto 1, administrado a 3, 10 y 30 mpk

30 Figuras 4-1 a 4-9: Evaluación *in vivo*, en los ratones db/db, de las propiedades sobre el peso corporal, de las propiedades antidiabéticas, hipolipemiantes y estimulantes de la síntesis de compuestos de colesterol HDL según la invención

El efecto de los compuestos según la invención se evalúa *in vivo* en ratones db/db por medición de la evolución del peso corporal, la determinación de las concentraciones de glucosa, de insulina, colesterol total y triglicéridos en el plasma así como mediante el análisis de la repartición del colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas en el plasma después de 28 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención. Estos parámetros se comparan con los obtenidos con los animales de referencia (no tratados con los compuestos según la invención): la diferencia medida demuestra el efecto sobre el peso corporal, la resistencia a la insulina, el efecto hipolipidémico de los compuestos según la invención.

- 35 - Figura 4-1: Ganancia de peso corporal después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk
- 40 - Figura 4-2: Glucemia después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk
- Figura 4-3: Insulinemia después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk
- Figura 4-4: Concentración de colesterol en el plasma después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1 y el compuesto 3, administrados a 50 mpk
- 45 - Figura 4-5: Distribución de colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas en plasma después de 28 días de tratamiento con compuesto 1 y el compuesto 3, administrados a 50 mpk
- Figura 4-6: Concentración de triglicéridos en el plasma después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1 y el compuesto 3, administrados a 50 mpk
- Figura 4-7: Concentración de ácidos grasos libres en el plasma después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1 y el compuesto 3, administrados a 50 mpk.

50 La eficacia de los compuestos según la invención se evalúa también mediante la determinación, en los tejidos

hepáticos y musculares (esqueléticos), de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos y la disipación de la energía. Los niveles de expresión de cada gen se normalizan con relación al nivel de expresión de los genes de referencia 36B4 en el tejido hepático o 18S en el músculo esquelético gastrocnemio. El factor de inducción, es decir la relación entre la señal relativa (inducida por el compuesto según la invención) y la media de los valores relativos del grupo de referencia, se calcula a continuación. Cuanto más elevado sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa como media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

- Figura 4-8: Expresión de PDK4 (piruvato deshidrogenasa cinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en ratones db/db después de 28 días de tratamiento con el compuesto 1 y el compuesto 3, administrados a 50 mpk

- Figura 4-9: Expresión de UCP2 (proteína de desacoplamiento 2) en el músculo esquelético, en ratones db/db después de 28 días de tratamiento con los compuestos 1 y 3, administrados a 50 mpk

Figura 5: Evaluación *in vitro* de las propiedades antiinflamatorias de compuestos según la invención mediante la determinación de la secreción de MCP1 por monocitos tratados con los compuestos según la invención y estimulados con PMA

Se han evaluado los efectos antiinflamatorios de los compuestos de la invención mediante la determinación de la secreción de MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1) por los monocitos THP1 tratados durante 24 horas con los compuestos según la invención y estimulados al mismo tiempo con PMA (12-miristato 13-acetato de forbol, provoca una respuesta inflamatoria de las células y su diferenciación en macrófagos). Cuanto mayor es la cantidad de MCP-1 segregada y disminuida, más inhibe el compuesto según la invención la reacción inflamatoria.

Análisis estadísticos

Los estudios estadísticos consisten en la prueba t de Student (<sup>0/00/000</sup>) y/o un análisis de la variancia univariada a un factor (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey (<sup>\*/\*\*/\*\*</sup>). Los resultados se comparan con el grupo de referencia según el valor del parámetro t:

<sup>0/</sup>\* : p <0,05; <sup>00/</sup>\*\* : p <0,01; <sup>000/</sup>\*\*\* : p <0,001.

## Ejemplos

Los reactivos y catalizadores convencionales se pueden adquirir en el mercado (Aldrich, Alfa Aesar, Acros, Fluka o Lancaster según el caso).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup>H) se han registrado en un espectrómetro Bruker AC300P. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (partes por millón) y las multiplicidades por las abreviaturas habituales.

Ejemplo 1: Descripción de los protocolos generales de síntesis de los compuestos descritos

La mayoría de los compuestos según la invención se pueden obtener especialmente por reducción según uno de los protocolos mencionados a continuación, de los compuestos reivindicados y/o descritos en la solicitud de patente US2005176808.

Otros compuestos pueden obtenerse fácilmente según modos de preparación similares bien conocidos y al alcance del experto en la materia.

Procedimiento general A: reducción de difenilpropen-2-onas por trietilsilano

Las difenilpropen-2-onas se disuelven en diclorometano. Después se añade trietilsilano, gota a gota, ácido trifluoroacético (7,5 equivalentes) La mezcla de reacción se coloca en agitación a temperatura ambiente y se sigue la evolución de la reacción por cromatografía en capa fina. Una vez consumido el material de partida, el medio se lava con agua. La fase acuosa se extrae con diclorometano, se reúnen las fases orgánicas, se secan sobre sulfato de magnesio y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía en gel de sílice (HPLC de preparación, LiChrospher (Merck) RP18 12 µm 100 Å, columna: 25 x 250 mm).

Procedimiento general B: reducción difenilpropen-2-onas por el tetraclorosilano

La difenilpropen-2-ona se disuelve en acetonitrilo. Se añade yoduro de sodio a continuación gota a gota tetraclorosilano. La mezcla de reacción se coloca en agitación a temperatura ambiente, el avance de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina. Una vez consumido el material de partida (30 min a 2 horas), el medio se diluye con cloroformo y después se lava con agua. La fase acuosa se extrae con cloroformo, las fases orgánicas se reúnen y se lavan con una solución saturada de sulfito de sodio y después se secan sobre sulfato de magnesio. El disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía en

gel de sílice (HPLC de preparación, LiChrospher (Merck) columna RP18 12 µm 100Å: 25x250 mm).

Procedimiento general C: reducción de las difenilpropen-2-onas por paladio sobre carbón

- 5 La difenilpropen-2-ona se disolvió en etanol y después se añade paladio sobre carbón (10%) en una cantidad catalítica. La mezcla de reacción se coloca en agitación bajo atmósfera de hidrógeno a presión atmosférica y temperatura ambiente. Una vez consumido el material de partida, el catalizador se elimina por filtración, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo de evaporación se purifica por cromatografía ultrarrápida.

Procedimiento General D: Síntesis de alcoholes

- 10 Se disuelve en etanol la difenilpropan-3-ona. Se añade borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se mantiene en agitación 16 horas a 50°C, la mezcla se enfría y se hidroliza. Los disolventes se eliminan por evaporación a presión reducida, el residuo se recoge con una solución acuosa diluida de ácido clorhídrico y se extrae con cloruro de metileno.

La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre sulfato de magnesio, el cloruro de metileno se elimina por evaporación a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC de preparación, LiChrospher (Merck) RP18 12 µm 100Å, columna: 25x250 mm).

- 15 Procedimiento general E: síntesis de éteres

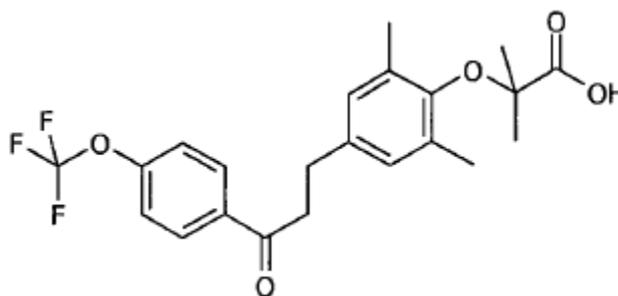
Se disuelve difenilpropan-3-ol en una mezcla de agua/alcohol 1/3:2/3 en presencia de una cantidad catalítica de ácido trifluoroacético. Después de 16 h de agitación a 60°C, el medio se evapora a presión reducida y el residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC de preparación, LiChrospher (Merck) RP18 12 µm 100Å, columna: 25x250 mm ).

- 20 Procedimiento general F: síntesis de oximas y éteres de oxima

Se disuelve difenilpropan-3-ona en piridina. Se añade el clorhidrato de O-alkilhidroxilamina. Después de 16 h de reflujo, el medio se evapora a presión reducida y el residuo de evaporación se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice.

Ejemplo 2 Síntesis de los compuestos descritos

- 25 Compuesto 1 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometoxi)-3-fenil-1-propilfenoxil-oxo-2-metilpropanoico



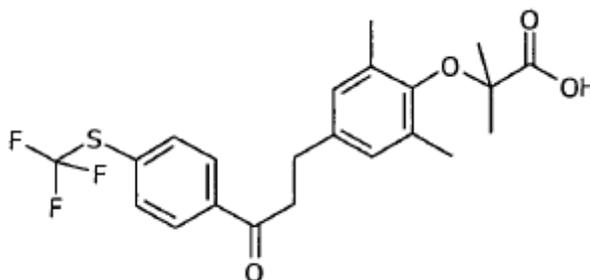
- 30 Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metilpropanoico con 15 equivalentes de yoduro de sodio y 15 equivalentes tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco, p.f.= 64-66°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,52 (s, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,96 (t, 2H, J = 7,51 Hz), 3,26 (t, 2H, J = 7,51 Hz), 6,87 (s, 2H), 7,28 (d, 2H, J = 8,61 Hz), 8,01 (d, 2H, J = 8,61 Hz).

MS (ES-MS): 423,3 (M-1).

- 35 Compuesto 2 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico



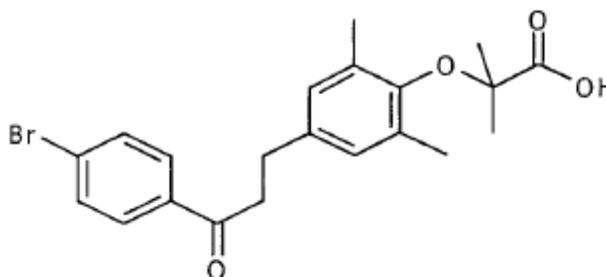
Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometilitio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxy]-2-metilpropanoico con 1 equivalente de trietilsilano;

Aspecto: sólido blanco, p.f.= 83-85°C.

- 5 RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,52 (s, 6H), 2,23 (s, 6H), 2,97 (t, 2H, J = 7,59 Hz), 3,29 (t, 2H, J = 7,59 Hz), 6,88 (s, 2H), 7,74 (d, 2H, J = 8,46 Hz), 7,99 (d, 2H, J = 8,46 Hz).

MS (ES-MS): 439,2 (M-1).

Compuesto 3 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxo-propil]fenoxy]-2-metilpropanoico

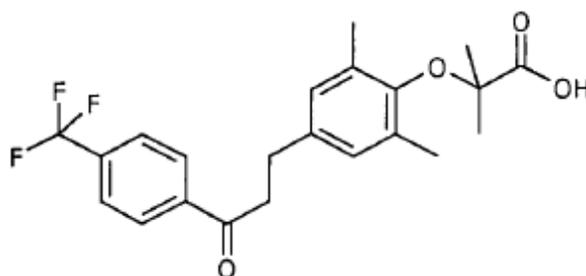


- 10 Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxy]-2-metilpropanoico con 1 equivalente de trietilsilano;

Aspecto: aceite viscoso blanco. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,52 (s, 6H), 2,23 (s, 6H), 2,96 (t, 2H, J = 7,60 Hz), 3,24 (t, 2H, J = 7,02 Hz), 6,89 (s, 2H), 7,61 (d, 2H, J = 8,46 Hz), 7,83 (d, 2H, J = 8,46 Hz).

MS (ES-MS): 417,2 (M-1)  $^{79}\text{Br}$  y 419,2 (M-1)  $^{81}\text{Br}$

- 15 Compuesto 4: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxo-propil]fenoxy]-2-metilpropanoico



Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxy]-2-metilpropanoico por medio de 1 equivalente de trietilsilano;

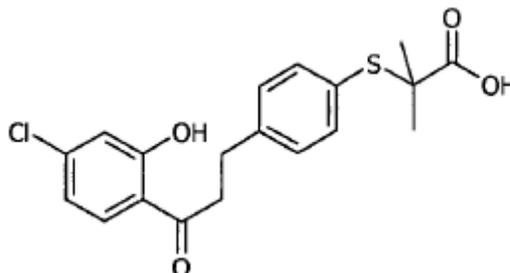
Aspecto: aceite viscoso amarillento.

- 20 RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,52 (s, 6H), 2,23 (s, 6H), 2,98 (t, 2H, J = 7,29 Hz), 3,30 (t, 2H, J = 7,29 Hz),

6,88 (s, 2H), 7,72 (d, 2H, J = 8,17 Hz), 8,06 (d, 2H, J = 8,17 Hz).

MS (ES-MS): 407,4 (M-1).

Compuesto 5: Ácido 2-[4-[3-[4-cloro-2-hidroxifenil]-3-oxo-propilfeniltio]-2-metilpropanoico



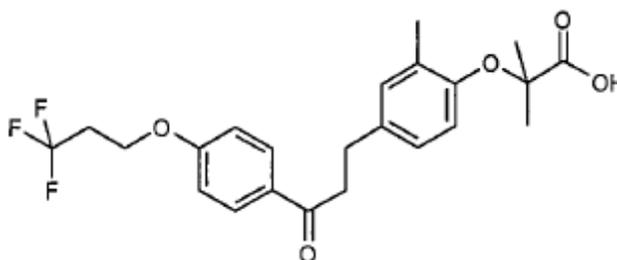
- 5 Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general B, partiendo del ácido 2-[4-[3-[4-cloro-2-hidroxifenil]-3-oxo-prop-2-enil]feniltio]-2-metil-propanoico con 5 equivalentes de yoduro de sodio y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco, p.f.= 136-137°C.

- 10 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,52 (s, 6H), 3,08 (t, 2H, J = 7,59 Hz), 3,30 (t, 2H, J = 7,59 Hz), 6,87 (dd, 1H, J = 1,89 Hz, J = 8,79 Hz), 7,02 (d, 1H, J = 1,89 Hz), 7,22 (d, 2H, J = 7,89 Hz), 7,47 (d, 2H, J = 8,19 Hz), 7,66 (d, 1H, J = 8,46 Hz), 12,38 (s, 1 H).

MS (ES-MS): 377,01 (M-1).

Compuesto 6: Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico



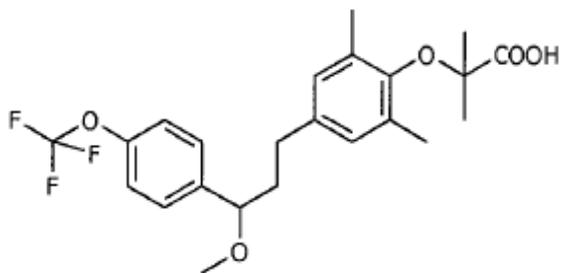
- 15 Este compuesto se ha preparado por reducción según el procedimiento general C del 2-(4-(3-(4-hidroxifenil)-3-oxo-prop-1-enil)-2-metilfenoxi)-2-metilpropanoato de terc-butilo, seguido de una secuencia de O-alkilación de fenol/acidólisis éster de terc-butilo según la patente US2005176808.

Aspecto: aceite viscoso incoloro.

- 20 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,60 (s, 6H), 2,23 (s, 3H), 2,61-2,70 (m, 2H); 2,95-2,99 (m, 2H), 3,19-3,24 (m, 2H), 4,26 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 6,77 (d, 1H, J = 8,5 Hz); 6,93 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 6,93-6,98 (m, 1 H), 7,06 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,95 (d, 2H, J = 8,9 Hz).

MS (ES-MS): 437,3 (M-1).

Compuesto 10 de la invención: Ácido 2-[4-(3-metoxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi]-2-metilpropanoico



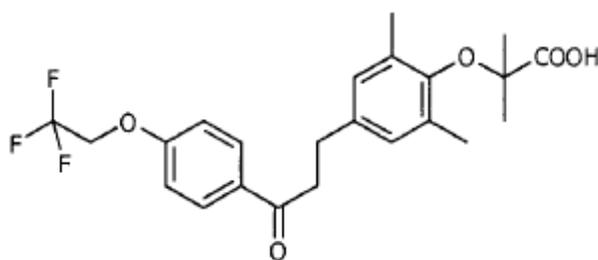
Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general E, a partir de una solución de ácido 2-(4-(3-hidroxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico en una mezcla agua/metanol 1/3 : 2/3.

Aspecto: aceite viscoso incoloro.

- 5 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,46 (s, 6H), 1,91-2,21 (m, 2H), 2,15 (s, 6H); 2,49-2,69 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 4,69 (dd, 1H, J = 7,7 Hz J = 5,1 Hz), 6,78 (s, 2H); 7,19 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,36 (d, 2H, J = 8,5 Hz).

MS (ES-MS): 458,3 (M + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 463,2 (M + Na<sup>+</sup>), 479,2 (M + K<sup>+</sup>).

Compuesto 12 de la invención: Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico



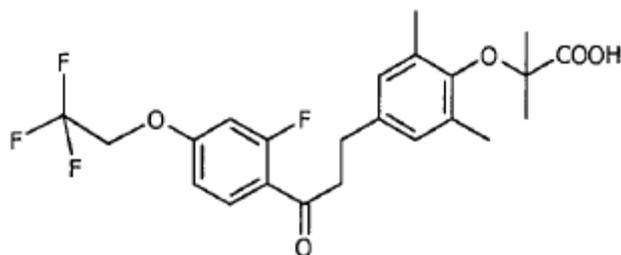
- 10 Este compuesto se ha preparado por reducción según el procedimiento general C del 2-(4-(3-(4-hidroxifenil)-3-oxo-prop-1-enil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoato de terc-butilo, seguido por una secuencia de O-alkilación de fenol/acidólisis del éster terc-butílico según la patente US2005176808.

Aspecto: sólido blanco, p.f.= 98-99°C.

- 15 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,45 (s, 6H), 2,17 (s, 6H), 2,89 (m, 2H), 3,18 (M, 2H), 4,40 (q, 2H, J = 8,1 Hz), 6,82 (s, 2H), 6,95 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 7,93 (d, 2H, J = 9,1 Hz).

MS (ES-MS): 437,4 (M-1).

Compuesto 17: Ácido 2-(4-(3-(2-fluoro-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-3-oxo-propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



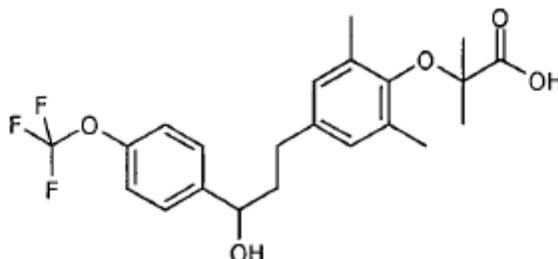
- 20 Este compuesto se ha preparado por reducción según el procedimiento general C del 2-(4-(3-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-3-oxo-prop-1-enil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoato de terc-butilo, seguido de una secuencia de O-alkilación de fenol/acidólisis del éster terc-butílico según la patente US2005176808.

Aspecto: aceite viscoso incoloro.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,51 (s, 6H), 2,21 (s, 6H), 2,92 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz), 3,23 (td, 2H,  $J = 7,6$  Hz  $J = 3,1$  Hz), 6,70 (dd,  $J = 8,7$  Hz  $J = 2,3$  Hz), 6,81 (dd,  $J = 12,6$  Hz  $J = 2,3$  Hz), 6,86 (s), 7,91 (t, 1H,  $J = 8,7$  Hz).

MS (MALDI-TOF): 479 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

- 5 Compuesto 30 de la invención: Ácido 2-(4-(3-hidroxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



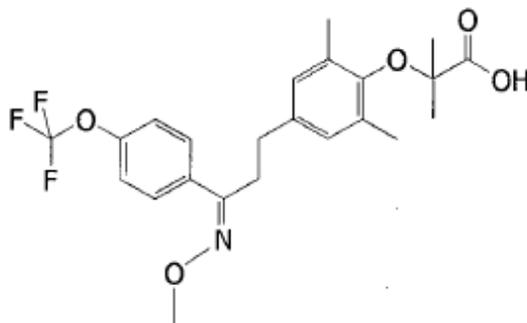
Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general D, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiloxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metil-propanoico con 4 equivalentes de borohidruro de sodio.

Aspecto: aceite viscoso incoloro.

- 10 RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,46 (s, 6H), 1,94-2,10 (m, 2H), 2,17 (s, 6H); 2,46-2,66 (m, 2H), 4,69 (dd, 1H,  $J = 7,6$  Hz  $J = 5,5$  Hz), 6,78 (s, 2H), 7,17 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz), 7,34 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz).

MS (ES-MS): 425,3 ( $\text{M}-1$ ).

Compuesto 33: Ácido-2-(4-(3-(metoxiimino)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico



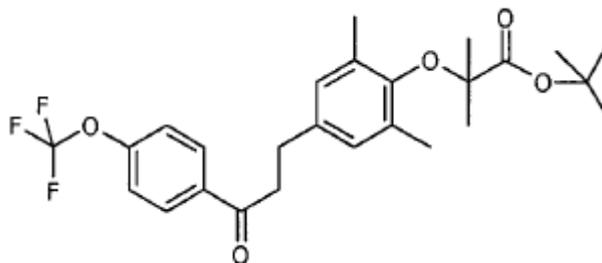
- 15 Este compuesto se ha preparado según el procedimiento general F, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico.

Aspecto: aceite viscoso amarillento.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm): 1,49 (s, 6H), 2,21 (s, 6H), 2,71-2,77 (m, 2H), 2,95-3,01 (m, 2H), 4,01 (s, 3H), 6,82 (s, 2H), 7,17 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,59 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz).

- 20 MS (ES-QTOF): 476 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

Compuesto 35 de la invención: 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoato de terc-butilo



Este compuesto se ha preparado por reducción según el procedimiento general C a partir de 3-(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil)-1-(4-(trifluorometoxi)fenil)propan-1-ona, seguido de una secuencia de O-alkilación de fenol/ acidólisis del éster butílico según la patente US2005176808.

5 Aspecto: aceite viscoso incoloro.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,42 (s, 6H), 1,51 (s, 9H), 2,21 (s, 6H), 2,94 (t, 2H, J = 7,9 Hz), 3,25 (t, 2H, J = 7,9 Hz), 6,82 (s, 2H), 7,28 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 8,01 (d, 2H, J = 9,1 Hz).

Pueden obtenerse otros compuestos por métodos de preparación similares a los procedimientos generales A a F y al alcance del experto en la materia.

10 Ejemplo 3: Evaluación *in vitro* de las propiedades activadoras de los PPAR de los compuestos según la invención

Las propiedades activadoras de los PPAR de los compuestos de la invención se evaluaron *in vitro*.

Principio

15 La activación de los PPAR se evaluó *in vitro* en una línea de fibroblastos de riñón de mono (COS-7) mediante la determinación de la actividad de transcripción de híbridos constituidos de dominio de enlace al ADN del factor de transcripción Gal4 de la levadura y del dominio de enlace a ligando de diferentes PPAR. Los compuestos se ensayaron a dosis comprendidas entre  $10^{-7}$  y 100  $\mu\text{M}$  en los híbridos Gal4-PPAR  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ .

Protocolo

Cultivo de células

20 Las células COS-7 provienen de la ATCC y se cultivan en medio DMEM enriquecido con 10% de medio (vol/vol) de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina (Gibco, Paisley, Reino Unido) y 2 mM de L-glutamina (Gibco, Paisley, Reino Unido). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de  $\text{CO}_2$ .

Descripción de los plásmidos utilizados en la transfección

25 Los plásmidos Gal4(RE)\_TkpGL3, pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$ , pGal4-hPPAR $\delta$  y pGal4 $\phi$  se han descrito en la bibliografía (Raspe E. *et al.*, 1999). Los montajes pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$  y pGal4-hPPAR $\delta$  se obtuvieron por clonación en el vector pGal4- $\phi$  de fragmentos de ADN amplificados por RCP correspondientes a los dominios DEF de los receptores nucleares PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$  humanos.

Transfección

30 Las células COS-7 en suspensión se transfectan con 150 ng de ADN por pocillo, con una relación de pGal4-PPAR/Gal4 (RE)\_TkpGL3 de 1/10 en presencia de 10% de suero de ternera fetal. Las células se sembraron a continuación en placas de 96 pocillos ( $4 \times 10^4$  células/pocillo) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. La activación de los compuestos de la prueba se efectúa durante 24 horas a 37°C en un medio libre de suero. Al final del experimento, se lisan las células y se determina la actividad luciferasa con ayuda del Steady-Lite<sup>TM</sup> HTS (Perkin Elmer) o Luciferasa Steady Glow (Promega) según las recomendaciones del proveedor.

Resultados

35 Los compuestos según la invención se ensayaron en las tres isoformas de PPAR. Los resultados obtenidos con los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 7 se detallan en las figuras (1-1) a (1-18).

Los inventores demuestran un aumento significativo y en función de la dosis de la actividad de luciferasa en las células transfectadas con plásmidos pGal4-hPPAR y tratadas con los compuestos según la invención.

Inesperadamente, los datos experimentales demuestran que los compuestos según la invención unen los PPAR *in vitro* e provocan una activación de la actividad de transcripción.

Ejemplo 4: Evaluación *in vivo*, en ratones ApoE2/E2, de las propiedades sobre el peso corporal, de las propiedades hipolipemiantes y la estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención

## 5 Principio

Se evaluaron *in vivo* las propiedades sobre el peso corporal y las propiedades hipolipemiantes de los compuestos según la invención por medición de peso corporal, por administración de lípidos plasmáticos y por análisis de la expresión génica de los genes diana de los PPAR después del tratamiento del ratón E2/E2 dislipidémico por los compuestos según la invención.

10 El modelo murino utilizado es el ratón de tipo ApoE2/E2, el ratón transgénico para la isoforma E2 de la apolipoproteína E humana (Sullivan P.M. *et al.*, 1998). En el hombre, esta apolipoproteína, constituyente de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL, VLDL), está presente en tres isoformas E2, E3 y E4. La forma E2 presenta una mutación en un aminoácido en la posición 158, lo que debilita considerablemente la afinidad de esta proteína para el receptor a los LDL. La depuración de VLDL por lo tanto, es casi nula. Se produce entonces una  
15 acumulación de lipoproteínas de baja densidad y una hiperlipidemia mixta denominada de tipo III (colesterol y triglicéridos elevados). PPAR $\alpha$  regula la expresión de genes implicados en el transporte de lípidos (apolipoproteínas tales como Apo AI, Apo AII y Apo CIII, transportadores membranarios tales como FAT) o el catabolismo de lípidos (ACO, CPT-I o CPT-II, enzimas de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos). Un tratamiento con activadores de PPAR $\alpha$  se traduce por lo tanto, en el hombre como en roedores, por una disminución de las concentraciones circulantes de  
20 triglicéridos. La determinación de los lípidos plasmáticos después del tratamiento con los compuestos de la invención será pues un indicador del carácter agonista de PPAR y por lo tanto del carácter hipolipemiante de los compuestos según la invención.

El tratamiento con activadores de PPAR se traduce también a veces en el hombre como en roedores, en un aumento de la concentración de colesterol HDL en el plasma. La determinación de la concentración de colesterol HDL en el  
25 plasma permite poner de relieve el carácter estimulante de la síntesis del colesterol HDL de los compuestos según la invención.

Las propiedades agonistas de PPAR $\alpha$  previamente medidas *in vitro* deben traducirse en el hígado en una sobre-expresión de la diana directamente bajo el control del receptor PPAR $\alpha$ : los genes que los inventores han estudiado en este experimento son el Apo CIII (apolipoproteína implicada en el metabolismo de los lípidos) y PDK-4 ( isoforma  
30 4 de la piruvato deshidrogenasa cinasa, enzima del metabolismo glucídico). La determinación de la actividad de transcripción de los genes diana de PPAR $\alpha$  después del tratamiento con los compuestos de la invención será por lo tanto también un indicador del carácter hipolipemiante de los compuestos según la invención.

## Protocolo

### Tratamiento de los animales

35 Ratones transgénicos Apo E2/E2 se han mantenido bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas a una temperatura constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Después de una semana de aclimatación, los ratones se han pesado y se reunieron en grupos de 6 animales seleccionados de manera que la distribución de sus pesos corporales y de sus concentraciones de lípidos plasmáticos determinadas una primera vez antes del experimento sean uniformes. Los compuestos ensayados se han puesto en suspensión en carboximetilcelulosa (Sigma C4888) y se han administrado  
40 por sonda intragástrica, una vez al día durante 8 días a la dosis elegida. Los animales han tenido libre acceso a agua y comida (dieta estándar). La ingesta de alimentos y el aumento de peso se registraron durante todo el experimento. Al final del experimento, los animales fueron anestesiados después de un ayuno de cuatro horas, se efectuó una extracción sanguínea en anticoagulante (EDTA) y los ratones se pesaron y sacrificaron. El plasma se separó por centrifugación a 3000 rev/min durante 20 minutos, las muestras se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ .

45 Se recogieron muestras de hígado y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  para los análisis posteriores.

### Determinación de los lípidos plasmáticos

Las concentraciones plasmáticas de lípidos (colesterol total y triglicéridos) se determinan por métodos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

50 Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma se determinaron después de 8 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención, estas concentraciones se compararon con las obtenidas con los animales de referencia (no tratados con los compuestos según la invención): la diferencia medida demuestra el efecto hipolipemiante de los compuestos según la invención.

### Determinación del colesterol HDL

Las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL) se precipitan con fosfotungstato. El precipitado se elimina por centrifugación. El colesterol HDL presente en el sobrenadante se cuantifica mediante ensayos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

Análisis de expresión génica por RT-RCP cuantitativa

- 5 Se extrae el ARN completo a partir de fragmentos de hígado utilizando el kit NucleoSpin<sup>®</sup> 96 ARN (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) según las instrucciones del fabricante.

10 1 µg de ARN completo (cuantificado utilizando kit de cuantificación de ARN Ribogreen (Molecular Probes)) a continuación, se transcribe de forma inversa en ADN complementario por una reacción de 1 hora a 37°C en un volumen total de 20 µl que contiene tampón 1X (Sigma), DTT 1,5 mM, dNTP 0,18 mM (Promega), 200 ng de pdN6 (Amersham), 30 U de inhibidor de RNasa (Sigma) y 1 µl de MMLV-RT (Sigma).

Los experimentos de RCP cuantitativa se han efectuado con el MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se realizaron utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix según las recomendaciones del fabricante, en placas de 96 pocillos, en 5 µl de reacciones de transcripción inversa diluidas con una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron pares de cebadores específicos para los genes estudiados:

- 15 • PDK4: cebador inverso: 5'-TACTCCACTGCTCCAACACCTG-3' (SEC. ID. nº: 1) y el cebador inverso 5'-GTTCTTCGGTTCCCTGCTTG-3' (SEC. ID. nº: 2)
- ApoCIII: cebador inverso: 5'-CTCTTGGCTCTCCTGGCATC-3' (SEC. ID. nº: 3) y el cebador inverso 5'-GCATCCTGGACCGTCTTGGA-3' (SEC. ID. nº: 4).

20 La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN inverso presente al inicio de la reacción y se amplifica durante la RCP. Para cada diana estudiada, se realiza una serie por diluciones sucesivas de un grupo formado por algunos µl de diferentes reacciones de transcripción inversa. Los niveles de expresión relativos de cada diana se determinan así utilizando las curvas de eficacia obtenidas con los puntos de la serie.

Los niveles de expresión de genes de interés se normalizan a continuación con respecto al nivel de expresión del gen de referencia 36B4 (cuyos cebadores específicos son:

- 25 cebador inverso: δ'-CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC-3' (SEC. ID. nº: 7) y cebador inverso: δ'-GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG-S' (SEC. ID. nº: 8)).

30 El factor de inducción, es decir la relación entre la señal relativa (inducida por el compuesto según la invención) y la media de los valores relativos del grupo de referencia, se calcula a continuación, para cada muestra. Cuanto más elevado sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa como media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

Resultados

Peso corporal

35 La figura 2-1 compara la ganancia de peso de los animales tras ocho días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 5, 10 y 50 mpk a la ganancia de peso de los animales de referencia. Inesperadamente, se mide una pérdida de peso corporal en los animales tratados con el compuesto 1.

Determinación de los lípidos plasmáticos

40 Las figuras 2-2 y 2-3 comparan las concentraciones plasmáticas de colesterol total y colesterol HDL tras 8 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 5, 10 y 50 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones circulantes de colesterol total se han reducido de manera muy significativa y las concentraciones de colesterol HDL han aumentado de manera muy significativa por el tratamiento.

Las figuras 2-4 y 2-5 comparan las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y ácidos grasos libres tras 8 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 5, 10 y 50 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones circulantes de triglicéridos y de ácidos grasos libres han disminuido de manera muy significativa por el tratamiento.

45 Análisis de la expresión génica por RT-RCP cuantitativa

50 Los inventores también han demostrado que los compuestos según la invención son, *in vivo*, reguladores de la expresión de genes diana de los PPAR. Los resultados presentados en las Figuras 2-6 y 2-7 muestran que el compuesto 1 administrado a 5, 10 y 50 mpk durante 8 días a ratones E2/E2 provocó un aumento significativo en la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (figura 2-6) y una disminución en la expresión hepática del gen que codifica ApoCIII (figura 2-7). Todos estos genes codifican enzimas que participan en gran medida en el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono y el hecho que su expresión sea modulada por los

compuestos según la invención refuerza la idea de que estos compuestos presentan un gran interés potencial en el marco de las enfermedades metabólicas.

#### Conclusión

5 Inesperadamente, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos según la invención inducen una pérdida de peso corporal *in vivo*, estimulan la síntesis de colesterol HDL en paralelo de un efecto hipolipemiente (disminución de las concentraciones en el plasma de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres). Además, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos de la invención modulan la expresión de los genes regulados por la activación de los PPAR que codifican enzimas muy implicadas en el metabolismo de los grasas y de los hidratos de carbono.

10 Ejemplo 5: Evaluación *in vivo*, en ratones C57Bl6, de las propiedades sobre el peso corporal, de las propiedades hipolipemiantes y estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención.

#### Principio

15 Se evalúa *in vivo* el peso corporal y las propiedades hipolipemiantes de los compuestos de la invención mediante la medición de peso corporal, mediante la administración de lípidos plasmáticos y por análisis de la expresión génica de los genes diana de los PPAR después del tratamiento por vía oral, con los compuestos según la invención, del ratón C57Bl6.

#### Protocolo

##### Tratamiento de animales

20 Ratones C57Bl6 hembras se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas a una temperatura constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Después de una semana de aclimatación, los ratones se pesaron y se reunieron en grupos de 6 animales seleccionados de manera que la distribución de su peso corporal y sus concentraciones de lípidos en el plasma determinadas una primera vez antes del experimento sean uniformes. Los compuestos de ensayo se pusieron en suspensión en carboximetilcelulosa (Sigma C4888) y se administraron por sonda intragástrica, una vez al día durante 14 días a la dosis elegida. Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (dieta estándar). La ingesta de alimentos y el aumento de peso se registraron durante todo el experimento. Al final del experimento, los animales se anestesiaron después de un ayuno de cuatro horas, se efectuó una extracción sanguínea en anticoagulante (EDTA) y los ratones se pesaron y sacrificaron. El plasma se separó por centrifugación a 3000 rev/min durante 20 minutos, las muestras se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ .

30 Se recogieron muestras de tejido hepático y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron después a  $-80^\circ\text{C}$  para posteriores análisis.

##### Determinación de colesterol HDL

Las lipoproteína de baja densidad (VLDL y LDL) se precipitan con fosfotungstato. El precipitado se separa por centrifugación. Se cuantificó el colesterol HDL en el sobrenadante mediante ensayos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

##### Determinación de los triglicéridos plasmáticos

Se determinaron las concentraciones de triglicéridos en plasma por métodos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

##### Análisis de expresión génica por RT-RCP cuantitativa

40 Se extrajo el ARN completo de fragmentos de hígado utilizando el kit NucleoSpin<sup>®</sup> 96 ARN (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) según las instrucciones del fabricante.

1  $\mu\text{g}$  de ARN completo (cuantificado por espectrofotometría) a continuación, se transcribió de forma inversa en ADN complementario mediante la reacción de 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  que contiene 1X tampón (Sigma), DTT 1,5 mM, dNTP 0,18 mM (Promega), 200 ng de pdN6 (Amersham) 30 U de inhibidor de RNasa (Sigma) y 1  $\mu\text{l}$  de MMLV-RT (Sigma).

45 Los experimentos de RCP cuantitativa se realizaron utilizando el MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se llevaron a cabo utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix según las recomendaciones del proveedor, en placas de 96 pocillos en 5  $\mu\text{l}$  de reacción de transcripción inversa diluida con una temperatura de hibridación de  $55^\circ\text{C}$ . Se han utilizado pares de cebadores específicos de los estudiados.

50 • PDK4: cebador directo 5'-TACTCCACTGCTCCAACACCTG-3' (SEC. ID. n°: 1) y el cebador inverso 5'-GTTCTTCGGTTCCCTGCTTG-3' (SEC. ID. n°: 2))

- ApoCIII: cebador directo: 5'-CTCTTGGCTCTCCTGGCATC-3' (SEC. ID. nº: 3) y el cebador inverso 5'-GCATCCTGGACCGTCTTGGA-3' (SEC. ID. nº: 4).

5 La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN complementario presente al principio de la reacción y amplificada durante la RCP. Para cada diana estudiada, se realiza una serie por diluciones sucesivas de un grupo integrado por unos pocos microlitros de diferentes reacciones de transcripción inversa. Los niveles de expresión relativos de cada diana se determinan así utilizando las curvas de eficacia obtenidas con los puntos de la serie.

Los niveles de expresión de los genes de interés se normalizaron a continuación en relación con el nivel de expresión del gen de referencia 36B4 (cuyos cebadores específicos son:

- 10 cebador directo: 5'-CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC-3' (SEC. ID. nº: 7) y el cebador inverso: 5'-GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG-3' (SEQ ID NO: 8)).

Se calculó a continuación el factor de inducción para cada muestra. Cuanto más alto sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa como la media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

## 15 Resultados

Peso corporal

La figura 3-1 compara la ganancia de peso de los animales después de 14 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 3, 10 y 30 mpk a la ganancia de peso de los animales de referencia. Inesperadamente, se mide una pérdida de peso corporal se mide en los animales tratados con el compuesto 1.

## 20 Determinación de los lípidos plasmáticos

La figura 3-2 compara las concentraciones de colesterol HDL en el plasma tras 14 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 3, 10 y 30 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones circulantes de colesterol HDL aumentaron de manera muy significativa por el tratamiento.

25 Figura 3-3 compara las concentraciones de triglicéridos en el plasma tras 14 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 3, 10 y 30 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones circulantes de triglicéridos disminuyeron de manera muy significativa por el tratamiento.

Análisis de la expresión génica por RT-RCP cuantitativa

30 Los inventores también han demostrado que los compuestos según la invención son, *in vivo*, reguladores de la expresión de los genes diana de los PPAR. Los resultados presentados en las figuras 3-4 y 3-5 muestran que el compuesto 1 administrado a 3, 10 y 30 mpk durante 14 días a ratones C57Bl6, provocó un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (figura 3-4) y una reducción de la expresión hepática del gen que codifica ApoCIII (figura 3-5). Todos estos genes codifican enzimas que participan en gran medida en el metabolismo de los lípidos y los hidratos de carbono y el hecho de que su expresión sea modulada por los compuestos según la invención refuerza la idea de que estos compuestos presentan un interés potencial mayor en el marco de las enfermedades metabólicas.

## 35 Conclusión

40 Inesperadamente, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos según la invención producen *in vivo* la pérdida de peso corporal, estimulan la síntesis de colesterol HDL en paralelo de un efecto hipolipemiente (disminución de las concentraciones de triglicéridos en el plasma). Además, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos de la invención modulan la expresión de genes regulados por la activación de los PPAR que codifican enzimas muy implicadas en el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono.

45 Ejemplo 6: Evaluación *in vivo*, en ratones db/db, de las propiedades sobre el peso corporal, de las propiedades antidiabéticas, hipolipemiantes y estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de compuestos según la invención.

Principio

50 Se evaluaron las propiedades sobre el peso corporal, resistencia a la insulina y las propiedades hipolipemiantes de los compuestos de la invención *in vivo* mediante la medición de peso corporal, mediante la determinación de las concentraciones en el plasma de glucosa e insulina, mediante administración de lípidos plasmáticos, análisis de la distribución de colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas plasmáticas y por análisis de la expresión

génica de genes diana de PPAR después del tratamiento por vía oral, mediante los compuestos según la invención, de ratones db/db.

#### Protocolo

#### Tratamiento de animales

- 5 Ratones db/db hembras se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas a una temperatura constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Después de una semana de aclimatación, los ratones se pesaron y se reunieron por grupos de ocho animales seleccionados de tal manera que la distribución de su peso corporal y de sus concentraciones de lípidos plasmáticos determinados una primera vez antes del experimento sean uniformes. Los compuestos de ensayo se pusieron en suspensión en carboximetilcelulosa (Sigma C4888) y se administraron por sonda intragástrica, una vez
- 10 al día durante 28 días a la dosis elegida. Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (dieta estándar). La ingesta de alimentos y el aumento de peso se registran durante todo el experimento. Al final del experimento, los animales fueron anestesiados después de un ayuno de cuatro horas, se efectuó una extracción sanguínea en anticoagulante (EDTA) y después los ratones se pesaron y sacrificaron. Se separó el plasma por centrifugación a 3000 rev/min durante 20 minutos, las muestras se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ . Se recogieron muestras de tejido hepático y el
- 15 tejido muscular esquelético y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y después se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  para análisis posteriores.

#### Determinación de la glucemia y de la insulina en el plasma

- Se analizó la glucosa murina en el plasma según un método enzimo-colorimétrico utilizando el kit Glucosa RTU (Biomérieux). La glucosa se transforma en ácido glucónico por la acción de la glucosa oxidasa de esta reacción liberada del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se dosifica según la reacción de Trinder que, por la
- 20 acción de una peroxidasa en presencia de fenol y 4-amino-antipirina, produce agua y un producto coloreado, quinonaimina. La intensidad de la coloración debida a la quinonaimina es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

- La dosificación de insulina murina se hizo por el método de ELISA (utilizando el kit INSKR020 del proveedor Crystal Chem). Un anticuerpo anti-insulina de ratón se recubre en una microplaca. El suero que debe administrarse para la insulina se deposita a continuación en esta placa. Un anticuerpos anti-insulina de cobaya reconocerá el complejo insulina/anticuerpo monoclonal anti-insulina de ratón y se fijará. Por último se añade un anticuerpo anti-cobaya
- 25 marcado con peroxidasa que se fija al anticuerpo anti-insulina de cobaya. La reacción colorimétrica se realiza mediante la adición del sustrato de la enzima OPD (orto-fenildiamina). La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de insulina presente en la muestra.
- 30

#### Determinación de los lípidos plasmáticos

Las concentraciones de lípidos en el plasma (colesterol total y triglicéridos) se determinan por métodos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

Análisis de la distribución de colesterol en las fracciones lipoproteicas en el plasma.

- 35 Las diferentes fracciones de lípidos (VLDL, LDL, HDL) del plasma se separaron por cromatografía en gel - filtración. Se determinaron las concentraciones de colesterol en cada fracción por ensayos enzimáticos (bioMérieux, Lyon, Francia) según las recomendaciones del proveedor.

#### Análisis de expresión génica por RT-RCP cuantitativa

##### Tejido hepático

- 40 El ARN completo se extrajo a partir de fragmentos de hígado utilizando el kit NucleoSpin® 96 ARN (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) según las instrucciones del fabricante.

##### Tejido esquelético

El ARN completo se extrajo a partir de fragmentos de músculo esquelético gastrocnemio utilizando el Kit RNeasy® Fibrous Tissue (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

- 45 1  $\mu\text{g}$  de ARN completo (cuantificado por espectrofotometría) a continuación, se transcribió de forma inversa en ADN complementario mediante una reacción de 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  que contiene tampón 1X (Sigma), DTT 1,5 mM, dNTPs 0,18 mM (Promega), 200 ng de pdN6 (Amersham), 30 U de inhibidor de RNasa (Sigma) y 1  $\mu\text{l}$  de MMLV-RT (Sigma).

- 50 Los experimentos de RCP cuantitativa se realizaron utilizando el MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se realizaron usando el kit iQ SYBR Green Supermix según lo

recomendado por el proveedor, en placas de 96 pocillos, en 5 µl de reacción de transcripción inversa diluida con una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron pares de cebadores específicos de los estudiados.

- PDK4: cebador directo: 5'-TACTCCACTGCTCCAACACCTG-3' (SEC. ID. nº: 1) y cebador inverso 5'-GTTCTTCGGTTCCCTGCTTG-3' (SEC. ID. nº: 2)

5 • UCP2: cebador directo: 5'-GTCGGAGATACCAGAGCACTGTGCG-3' (SEC. ID. nº: 5) y el cebador inverso 5'-CACATCAACAGGGGAGGCGA-3' (SEC. ID. nº: 6)

La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN complementario presente al inicio de la reacción y se amplifica durante la RCP. Para cada diana estudiada, se realiza una serie por diluciones sucesivas de un grupo constituido por unos pocos microlitros de diferentes reacciones de transcripción inversa. Los niveles de expresión relativa de cada diana se determinan así utilizando las curvas de eficacia obtenidas con los puntos de la serie.

Los niveles de expresión de genes de interés se normalizaron a continuación en el tejido hepático con relación al nivel de expresión del gen de referencia 36B4 (cuyos cebadores específicos son: cebador directo: 5'-CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC-3' (SEC. ID. nº: 7) y cebador inverso: 5'-GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG-3' (SEC. ID. nº: 8)) y en el tejido muscular esquelético en comparación con el nivel de expresión del gen de referencia 18S (cuyo cebadores específicos son: primer directo: 5'-CGGACACGGACAGGATTGACAG-3' (SEC. ID. nº: 9) y el cebador inverso: 5'-AATCTCGGGTGGCTGAACGC-3' (SEC. ID. nº: 10)). Se calculó a continuación el factor de inducción para cada muestra. Cuanto más alto sea este factor, mayor será el carácter activador de la expresión génica del compuesto. El resultado final se representa en valores medios de inducción en cada grupo experimental.

#### Resultados

##### Peso corporal

La figura 4-1 compara la ganancia de peso de los animales tras 28 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 50 mpk a la ganancia de peso de los animales de referencia.. Inesperadamente, se mide una pérdida de peso corporal en los animales tratados con el compuesto 1.

##### Determinación de la glucemia y de la insulinemia

Las figuras 4-2 y 4-3 comparan las concentraciones de glucosa en el plasma y de insulina tras 28 días de tratamiento con el compuesto 1 administrado a 50 mpk. Inesperadamente, la glucemia y la insulinemia se disminuyeron de manera significativa por el tratamiento.

##### Determinación de los lípidos plasmáticos

La figura 4-4 compara las concentraciones de colesterol total en el plasma tras 28 días de tratamiento con los compuestos 1 y 3 administrados a 50 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones totales de colesterol aumentaron significativamente. La figura 4-5 demuestra que este aumento del colesterol total en el plasma corresponde a un aumento significativo de la fracción colesterol HDL inducido por el tratamiento de los animales con los compuestos de 1 y 3 a 50 mpk.

Las figuras 4-6 y 4-7 comparan las concentraciones en el plasma de triglicéridos y ácidos grasos libres tras 28 días de tratamiento con los compuestos 1 y 3 administrados a 50 mpk a las concentraciones obtenidas con los animales de referencia. Inesperadamente, las concentraciones circulantes de triglicéridos y de ácidos grasos libres disminuyeron de manera muy significativa por los tratamientos.

##### Análisis de la expresión génica por RT-RCP cuantitativa

Los inventores también han demostrado que los compuestos según la invención son, *in vivo*, reguladores de la expresión de los genes diana de los PPAR. Los resultados presentados en las figuras 4-8 y 4-9 muestran que los compuestos 1 y 3 administrados a 50 mpk durante 28 días en ratones db/db, producen un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (figura 4-8) y una disminución de la expresión en el músculo esquelético del gen que codifica UCP2 (Figura 4-9). Todos estos genes codifican enzimas que participan en gran medida en el metabolismo de los lípidos, hidratos de carbono y la disipación de energía y el hecho de que su expresión sea modulada por los compuestos según la invención refuerza la idea de que estos compuestos presentan un interés potencial mayor en el marco de los trastornos metabólicos.

#### Conclusión

50 Inesperadamente, los datos experimentales muestran que los compuestos según la invención producen *in vivo* una pérdida de peso corporal, una mejora de sensibilidad a la insulina, estimulan la síntesis de colesterol HDL en paralelo con un efecto hipolipemiante (disminución de las concentraciones de triglicéridos en el plasma). Además, los

datos experimentales presentados demuestran que los compuestos según la invención modulan la expresión de genes regulados por la activación de los PPAR que codifican enzimas implicadas en gran medida en el metabolismo de los lípidos, hidratos de carbono y la disipación de la energía.

Ejemplo 7: Evaluación *in vitro* de propiedades antiinflamatorias de los compuestos según la invención

## 5 Principio

Los efectos antiinflamatorios de los compuestos según la invención se evaluaron mediante la determinación de la secreción de MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1) por los monocitos tratados durante 24 horas con los compuestos según la invención y al mismo tiempo estimulados con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, provoca una respuesta inflamatoria de las células y su diferenciación en macrófagos). Cuanto más disminuye la cantidad de MCP1 segregada, más inhibe la reacción inflamatoria el compuesto de la invención.

## Protocolo

Cultivo y tratamiento de las células THP-1.

La estirpe de monocitos humanos THP1 (proveniente de la ATCC) se cultiva en medio RPMI1640 enriquecido con Hepes 25 mM (Gibco; 42401-018), 1% de glutamina (Gibco; 25030-24) 1% de penicilina/estreptomina (Biochrom AG, A 2213) y 10% suero de ternera fetal sin complemento (SVF. Gibco, 26050-088).

Las células sembradas en placas de 24 pocillos ( Primaria BD Falcon) a una densidad de 870.000 células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h en medio de cultivo que contiene 0,2% de suero de ternera fetal en presencia de 5 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 1 µM del compuesto 3 según la invención. El compuesto según la invención se disuelve en sulfóxido de dimetilo (DMSO, Fluka, 41640). El efecto de los compuestos según la invención se compara con el efecto del DMSO solo.

## Determinación de la secreción de MCP 1

Se recupera el medio de tratamiento y se determina la concentración de MCP-1 utilizando el kit de ELISA "Human MCP-1 ELISA Set" (BD OptEIA; 555179) según las recomendaciones del fabricante. MCP1 se fija en una placa y es reconocido por un anticuerpo específico anti-MCP1. El anticuerpo es reconocido específicamente, a su vez, por un segundo tipo de anticuerpos acoplado a una enzima peroxidasa. La coloración resultante de la actividad de la enzima es proporcional a la cantidad de MCP1 fijada y se puede medir por espectrofotometría. Se realiza una serie a partir de un punto de concentración conocida y permite calcular la concentración de MCP1 en cada muestra.

Se calculó a continuación el factor de inducción, es decir la relación entre la señal inducida por el compuesto según la invención, y la señal del grupo de referencia. Cuanto menor sea este factor, más carácter inhibitorio de la secreción de MCP1 tendrá el compuesto. El resultado final se representa como media de los valores de inducción de cada grupo experimental.

## Resultados

Los inventores han demostrado, en monocitos *in vitro*, que los compuestos según la invención tienen efectos antiinflamatorios. Los resultados presentados en la Figura 5 demuestran que el compuesto 3 según la invención, a 1µM, produce una disminución significativa en la secreción de MCP-1 por los monocitos.

## Conclusión

Inesperadamente, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos según la invención tienen una acción anti-inflamatoria en monocitos estimulados con PMA.

## Conclusión general

Los inventores han demostrado que los compuestos según la invención conllevan una pérdida de peso corporal, tienen propiedades hipolipemiantes, reducen las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma, las propiedades estimulantes de la síntesis de colesterol HDL, así como propiedades antidiabéticas. Además, los inventores han demostrado que los compuestos según la invención son reguladores de la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en gran medida en el metabolismo de los lípidos, los hidratos de carbono y la disipación de la energía.

Los inventores han demostrado asimismo que los compuestos según la invención presentan propiedades antiinflamatorias.

Estos resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* demuestran potencial terapéutico de los compuestos según la invención frente a las principales enfermedades tales como las dislipidemias, la diabetes tipo 2 y la obesidad.

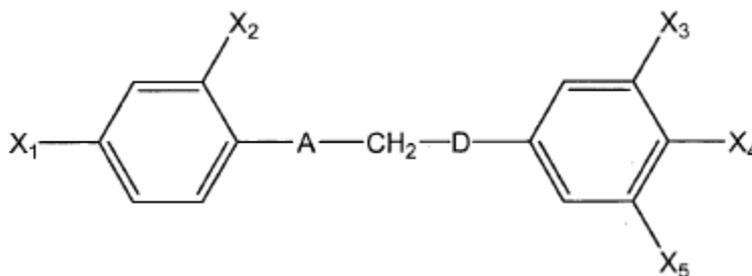
50

**Bibliografía**

- Fox-Tucker J., *The Cardiovascular Market Outlook to 2010*, BUSINESS INSIGHTS REPORTS, 2005, 1-174
- Gross B., *et al.*, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor b/d: A novel target for the reduction of atherosclerosis*, DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, 2005, 2 (3), 237-243
- 5 International Atherosclerosis Society, *Harmonized Clinical. Guidelines on Prevention of Atherosclerotic Vascular Disease*, 2003,
- Kota B.P., *et al.*, *An overview on biological mechanisms of PPAR*, Pharmacol Res., 2005, 51 (2), 85-94
- Lefebvre P., *et al.*, *Sorting out the roles of PPARalpha in energy metabolism and vascular homeostasis*, *J. Clin. Invest.*, 2006, 116 (3), 571-580
- 10 Lehrke M. y Lazar M.A., *The many faces of PPARgamma*, *Cell*, 2005, 123 (6), 993-9
- Liu Y. y Miller A., *Ligands to peroxisome proliferator-activated receptors as therapeutic options for metabolic syndrome*, DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, 2005, 2 (3), 165-169
- Mensah M., *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, 2004,
- 15 Raspe E., *et al.*, *Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR{alpha} activation*, *J. Lipid Res.*, 1999, 40 (11 ), 2099-2110
- Sullivan P.M., *et al.*, *Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe\*2*, *J. Clin. Invest.*, 1998, 102 (1), 130-5.

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos derivados de 1,3-difenilpropano sustituidos de fórmula general (I):

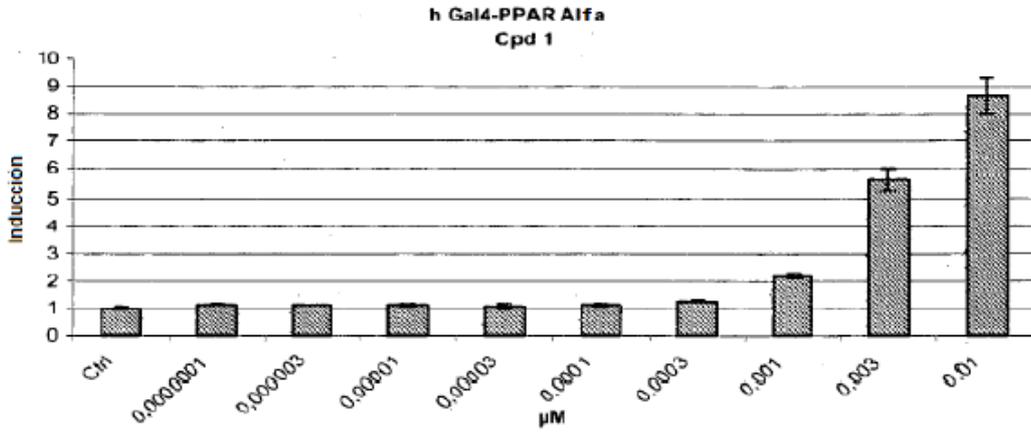


(I)

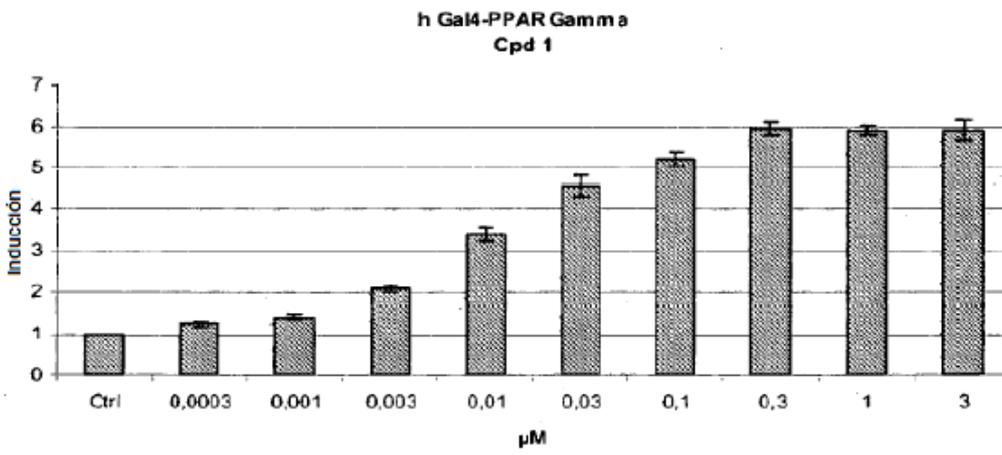
en la que:

- 5 X1 representa un átomo de halógeno, un grupo R1 o G1-R1;  
 X2 representa un átomo de hidrógeno;  
 X3 representa un grupo R3;  
 X4 representa G4-R4 en el que G4 representa un átomo de oxígeno;  
 X5 representa un grupo R5;
- 10 representando R1 un grupo alquilo halogenado;  
 representando R3 y R5, idénticos o diferentes, un grupo alquilo no sustituido;  
 representando G1 un átomo de oxígeno o de azufre;  
 representando R4 un grupo alquilo sustituido por un grupo COOR9;
- A representa:
- 15 (i) un grupo-CR6R7 en el que:  
 R6 representa un átomo de hidrógeno,  
 y R7 representa un grupo hidroxilo o un grupo -OR8, representando R8 un grupo alquilo, sustituido o no por un grupo arilo, heteroarilo o cicloalquilo;  
 o
- 20 (ii) un grupo carbonilo,  
 D representa un átomo de carbono unido a dos átomos de hidrógeno,  
 representando R9 un átomo de hidrógeno o un radical alquilo no sustituido;  
 sus estereoisómeros, diastereoisómeros, enantiómeros, puros o en mezcla, mezclas racémicas, isómeros geométricos, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, formas sólidas así como sus mezclas.
- 25 2. Compuestos según la reivindicación 1, caracterizados por que A representa un grupo carbonilo (CO).
3. Compuestos según la reivindicación 1 o 2, caracterizados por que X4 representa un grupo G4R4, en el que G4 representa un átomo de oxígeno y R4 representa un grupo alquilo que comprende 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido por un grupo -COOR9, siendo R9 tal como se ha definido en la reivindicación 1.
- 30 4. Compuestos según la reivindicación 3, caracterizados por que el grupo X4 responde a la fórmula -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOR9, siendo R9 tal como se ha definido en la reivindicación 1.
5. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que R3 y R5 representan un grupo alquilo no sustituido que comprende 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono.

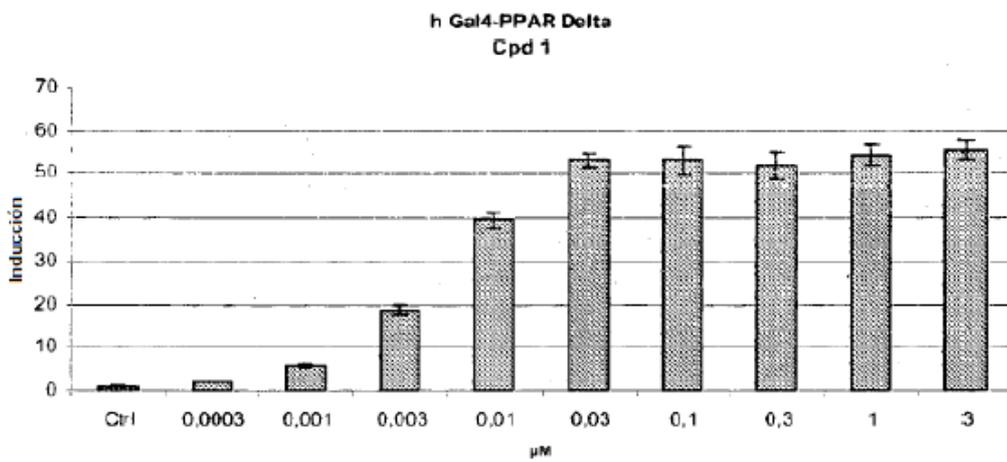
6. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que X1 representa un átomo de halógeno o un grupo G1R1, siendo G1 tal como se ha definido en la reivindicación 1 y representando R1 un grupo alquilo halogenado que lleva 1, 2 o 3 átomos de carbono.
- 5 7. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que se seleccionan entre:
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiltio)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico,
- 10 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-hidroxi-3-[4-(trifluorometiltio)fenil]propil]fenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-(piridin-3-ilmetoxi)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil]fenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[4-(3-(4-yodobenciloxi)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[4-(3-metoxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi]-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico,
- 15 Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetilthio)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico,  
 Ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)propanoico,  
 Ácido 2-(4-(3-hidroxi-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)-2,6-dimetilfenoxi)-2-metilpropanoico,  
 Ácido 4-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoico,
- 20 2-(2,6-dimetil-4-(3-Oxo-3-(4-(Trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoate de terc-butilo,  
 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoato de isopropilo.
8. Composición farmacéutica que comprende, en un soporte farmacéuticamente aceptable, al menos un compuesto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 7, posiblemente en combinación con uno o varios otros principios activos terapéuticos y/o cosméticos.
- 25 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para el tratamiento de trastornos asociados al síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la diabetes, dislipidemias, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, la hipertensión, las enfermedades inflamatorias, las patologías neurodegenerativas o los cánceres.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para el tratamiento de las dislipidemias.
- 30 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para tratar los factores de riesgo cardiovascular relacionados con trastornos del metabolismo de los lípidos y/o de los hidratos de carbono.



**Figura 1-1**



**Figura 1-2**



**Figura 1-3**

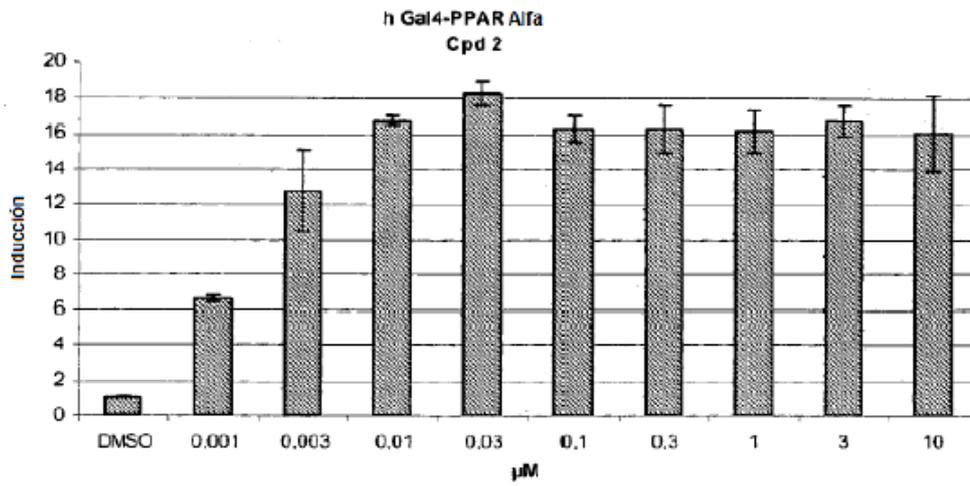


Figura 1-4

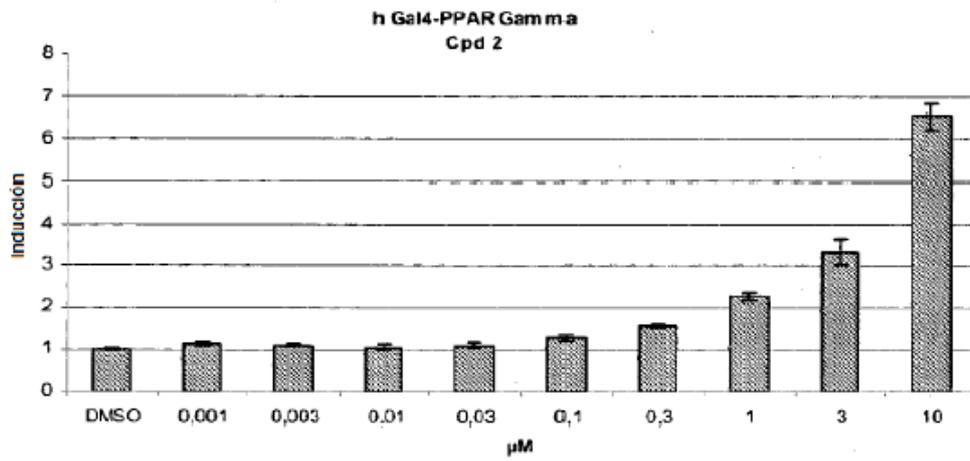


Figura 1-5

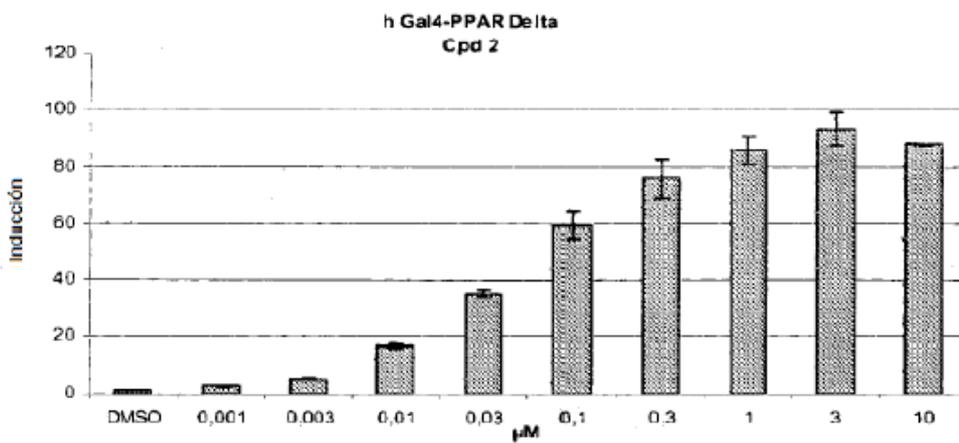
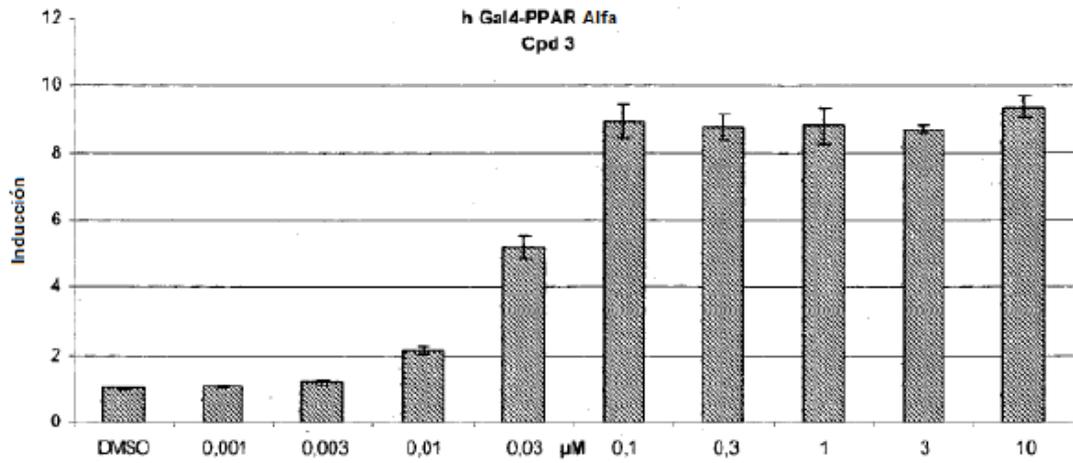
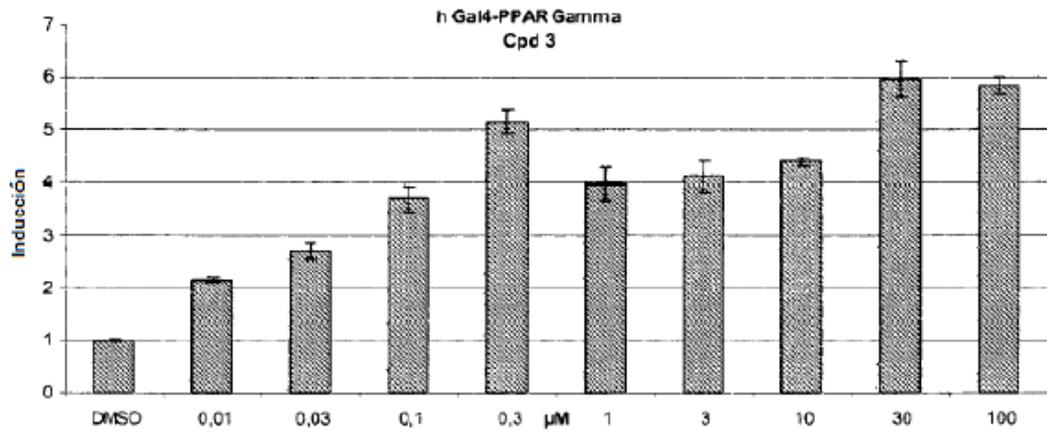


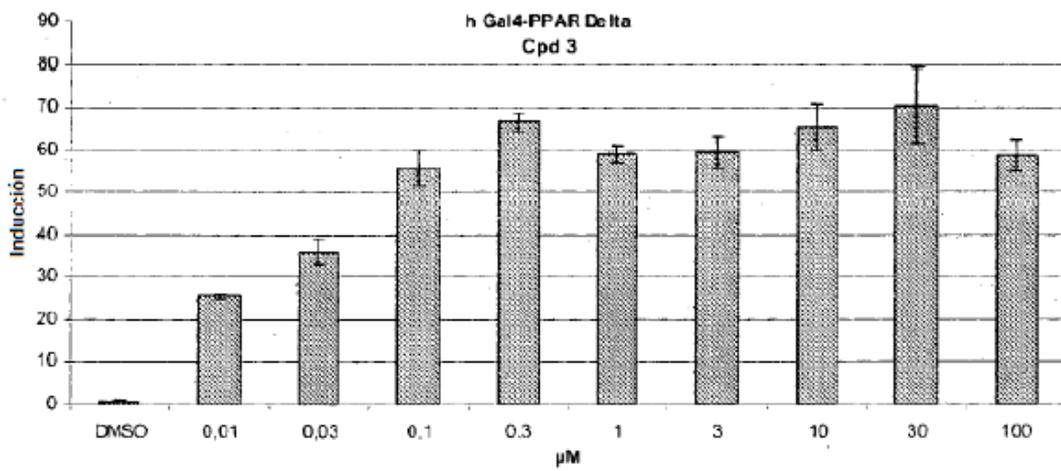
Figura 1-6



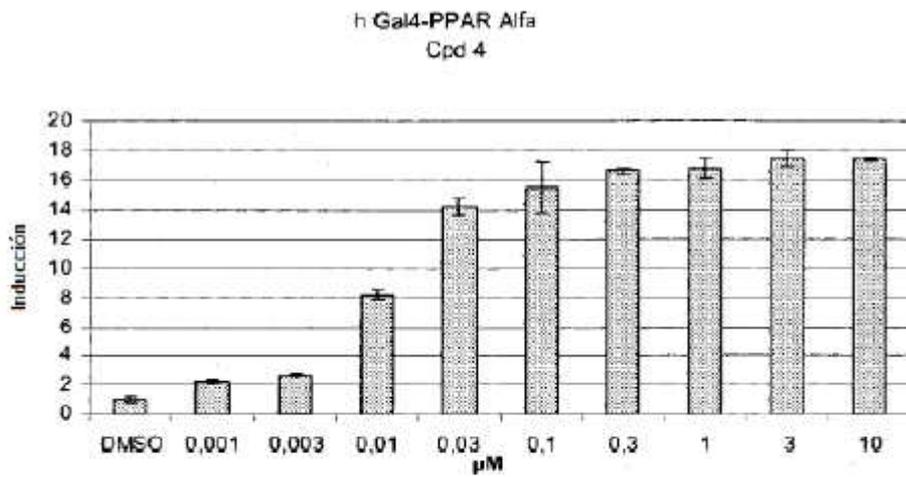
**Figura 1-7**



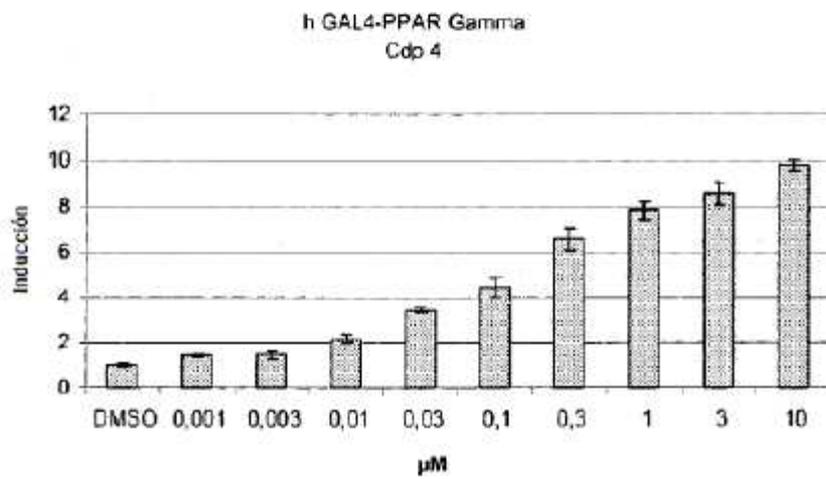
**Figura 1-8**



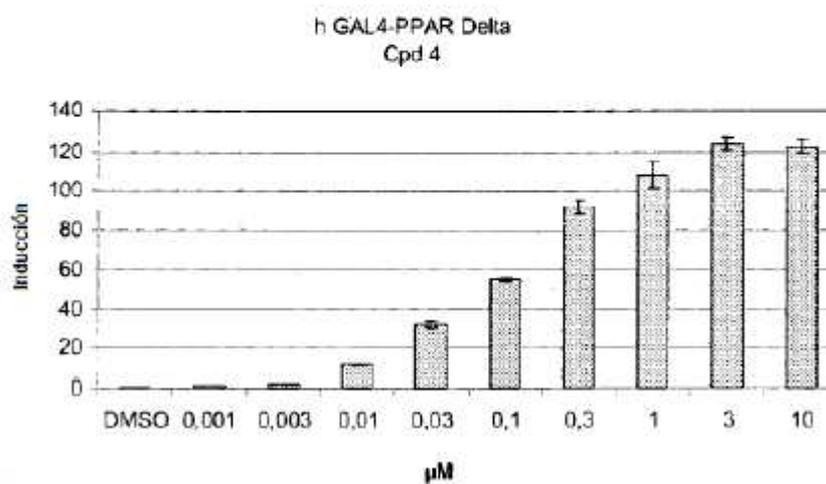
**Figura 1-9**



**Figura 1-10**



**Figura 1-11**



**Figura 1-12**

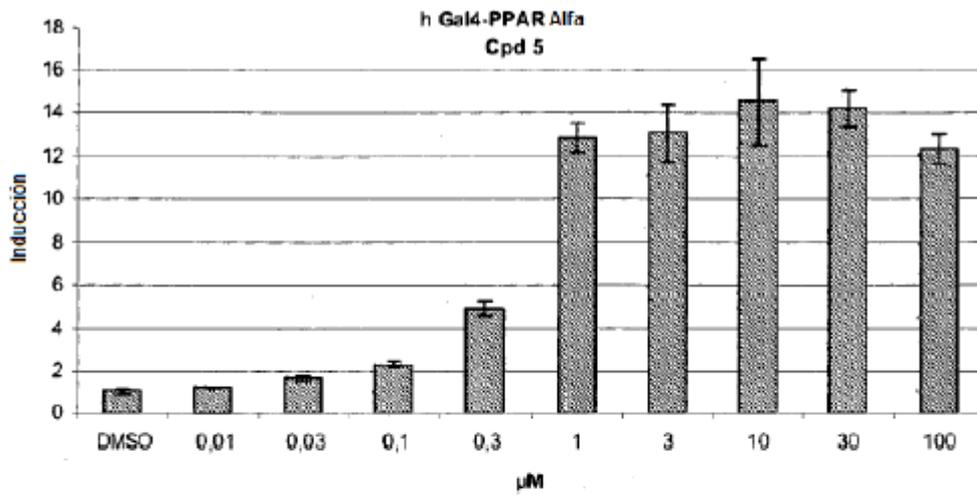


Figura 1-13

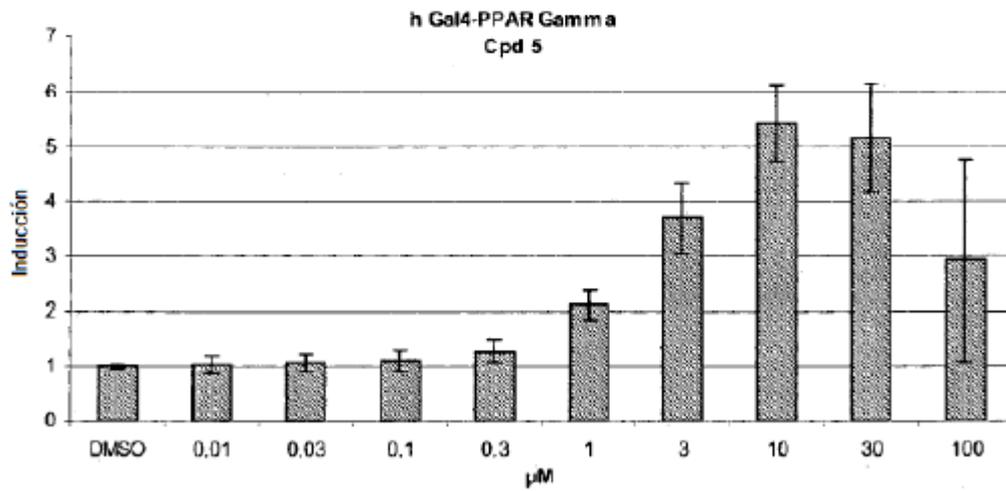
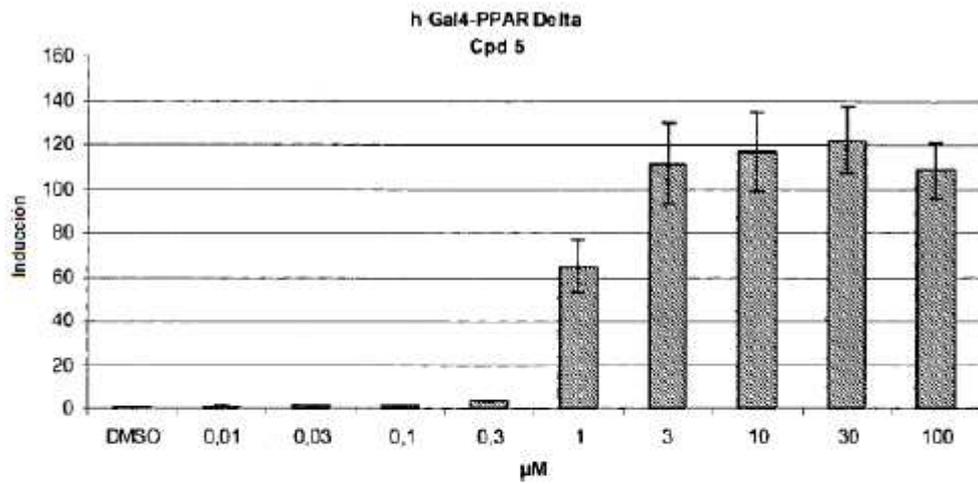
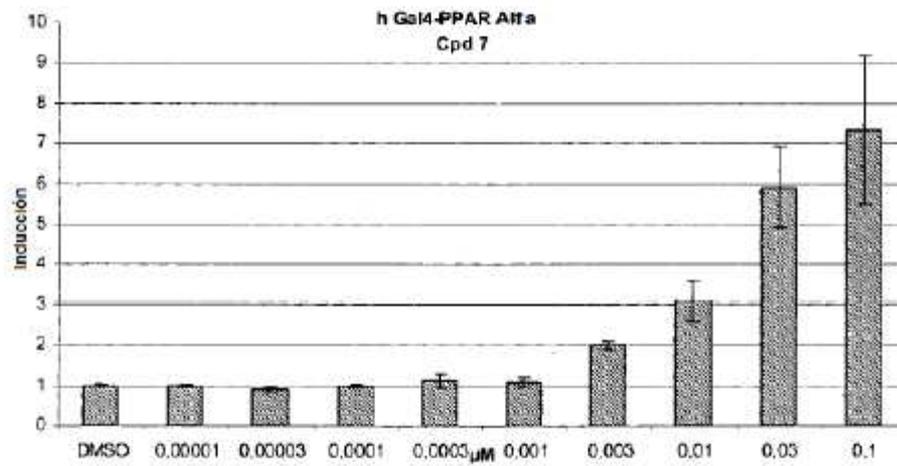


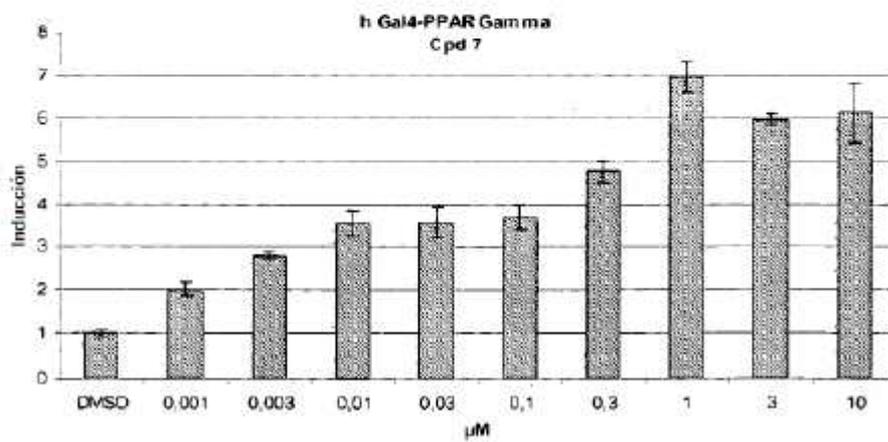
Figura 1-14



**Figura 1-15**



**Figura 1-16**



**Figura 1-17**

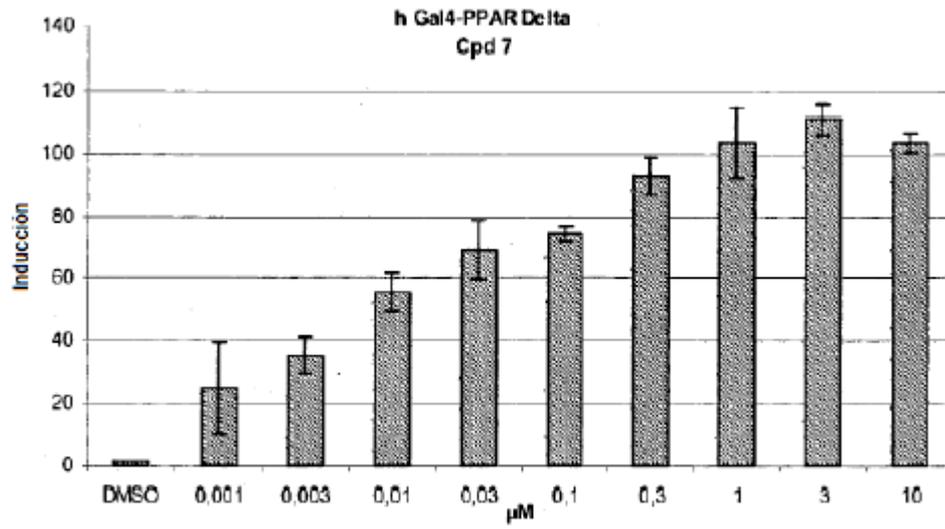


Figura 1-18

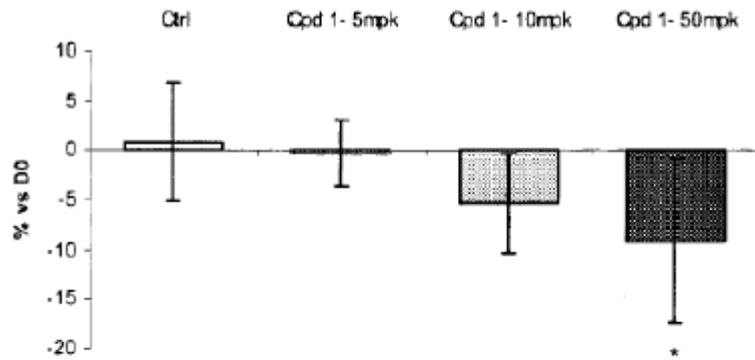


Figura 2-1

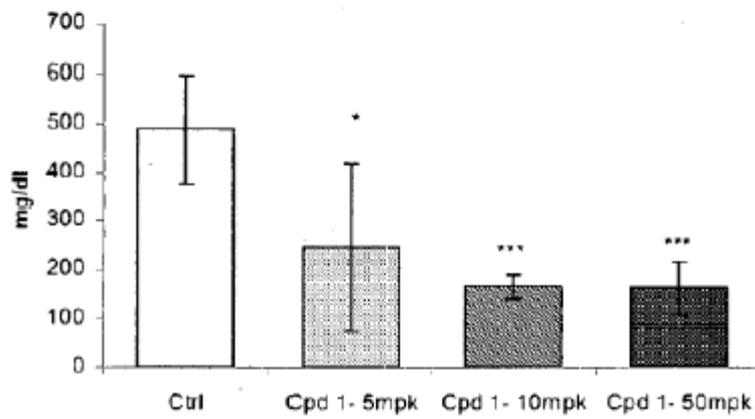


Figura 2-2

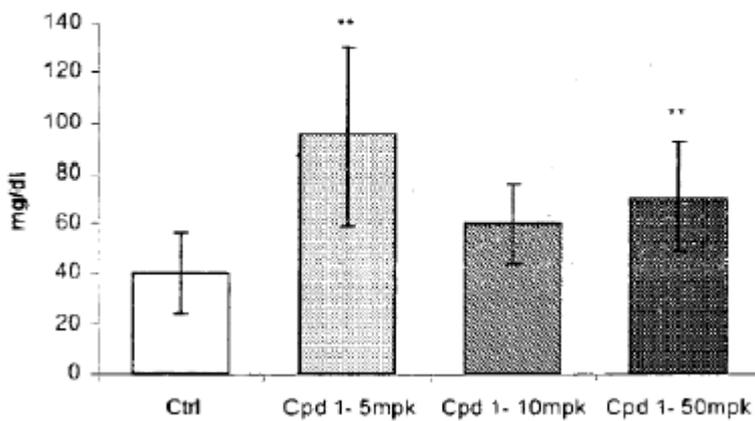


Figura 2-3

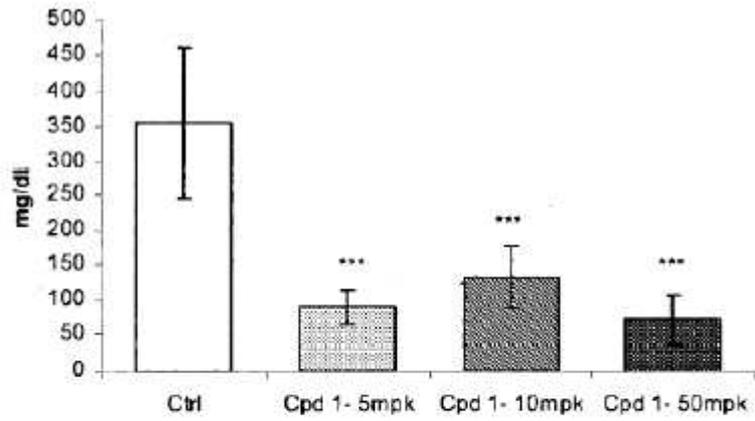


Figura 2-4

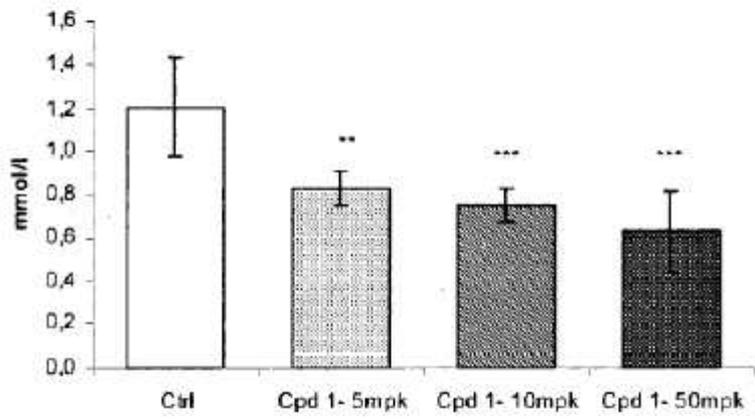


Figura 2-5

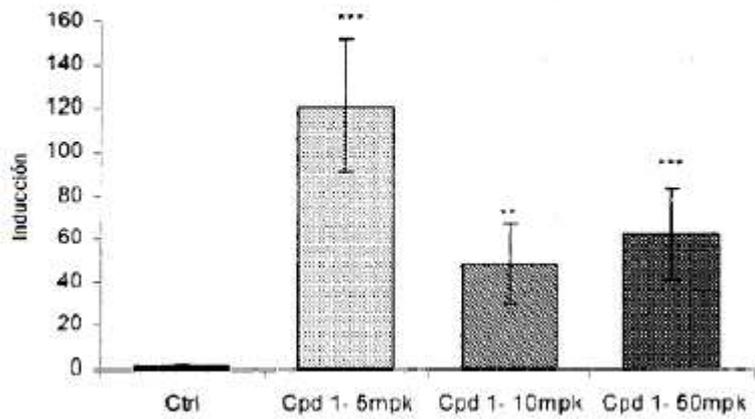
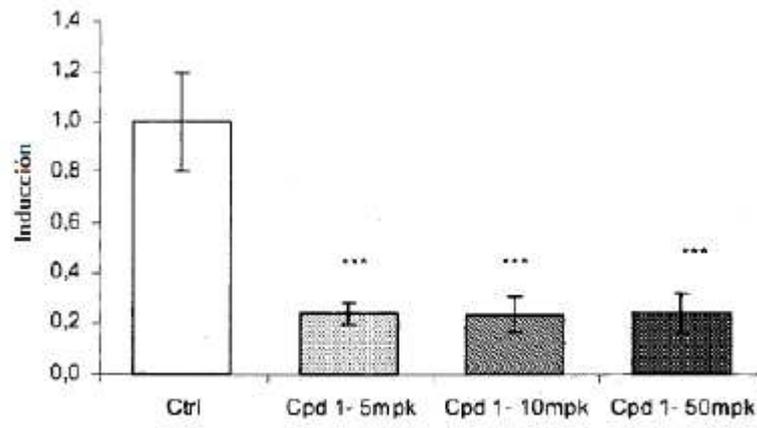


Figura 2-6



**Figura 2-7**

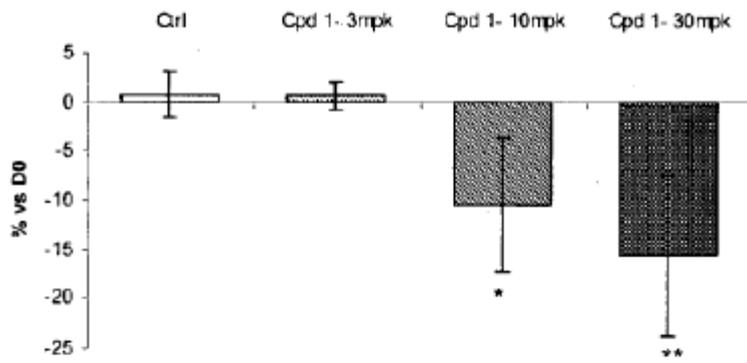


Figura 3-1

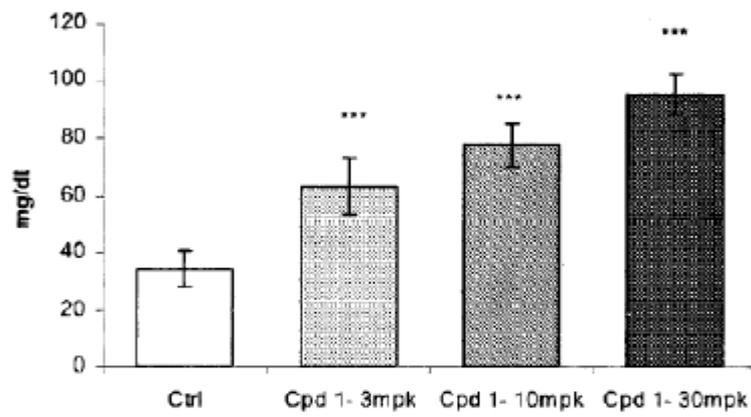


Figura 3-2

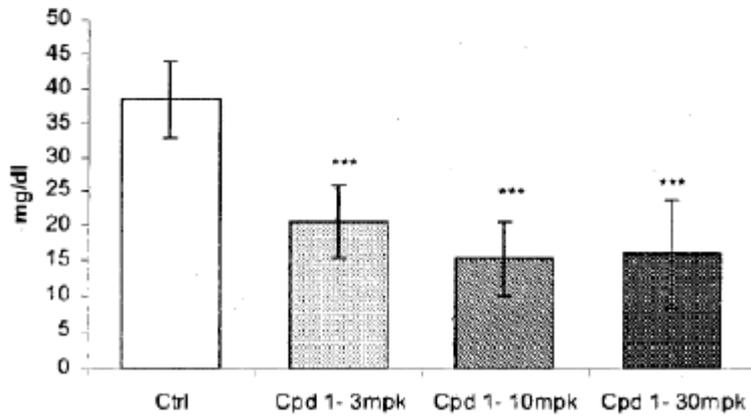


Figura 3-3

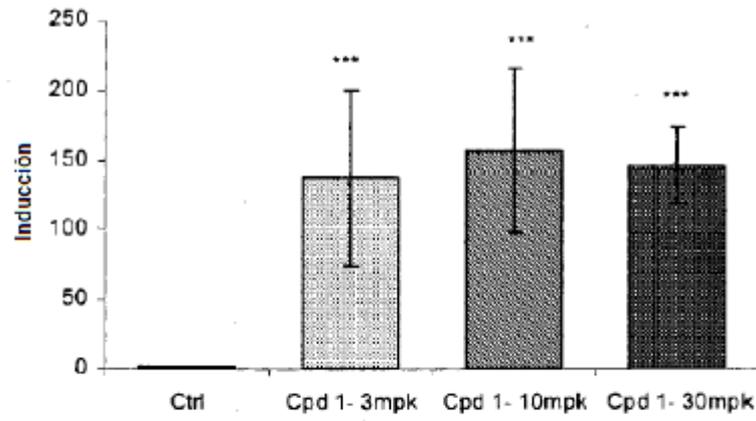


Figura 3-4

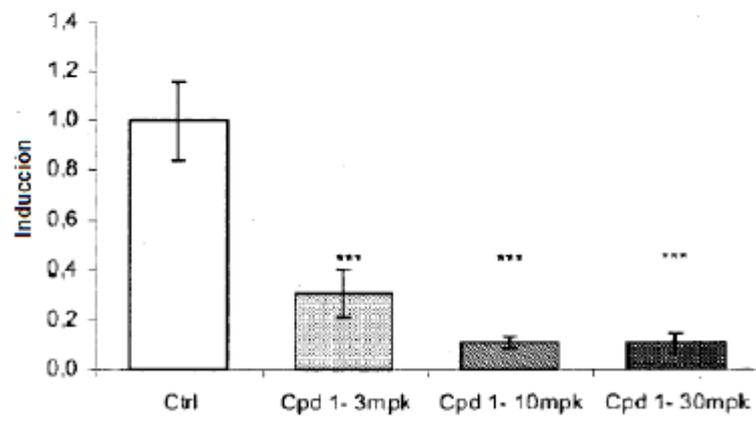


Figura 3-5

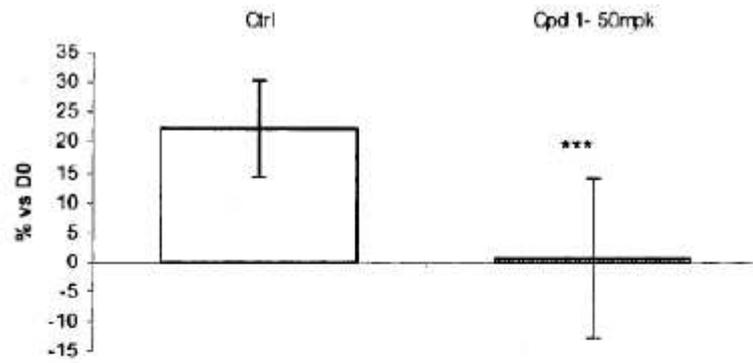


Figura 4-1

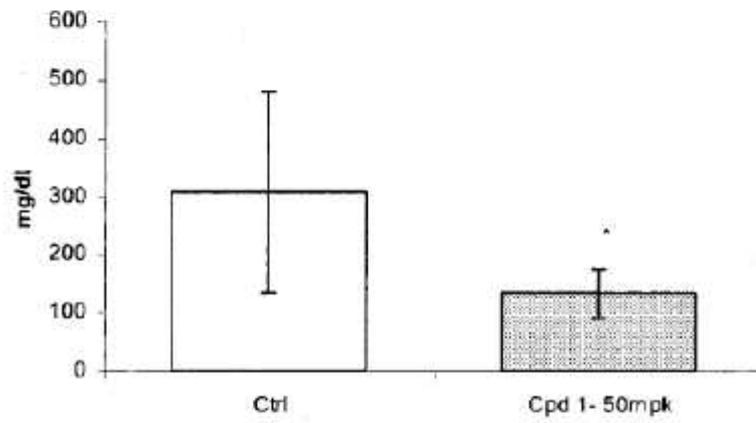


Figura 4-2

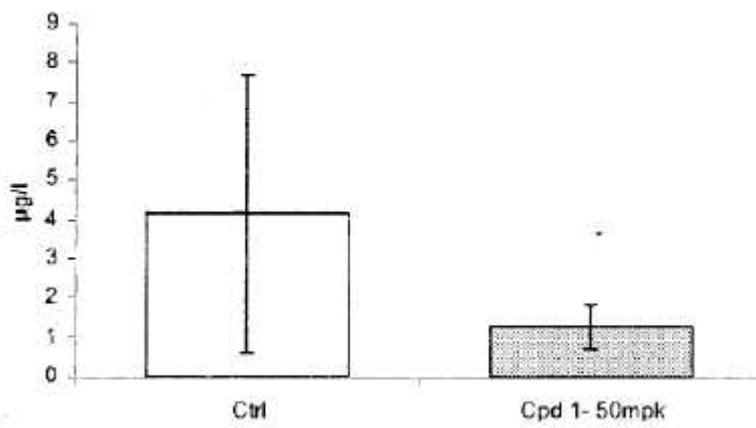


Figura 4-3

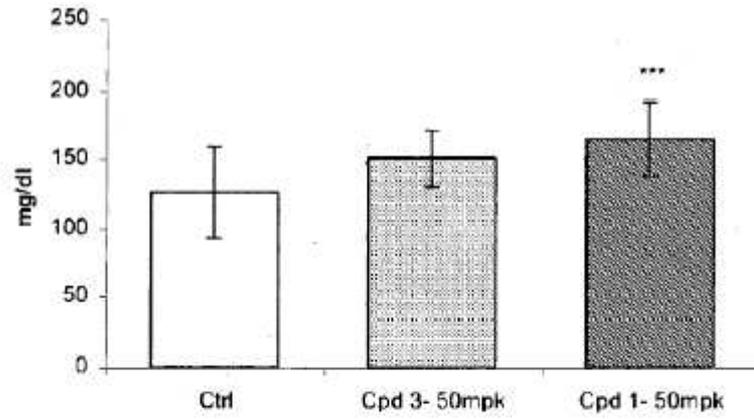


Figura 4-4

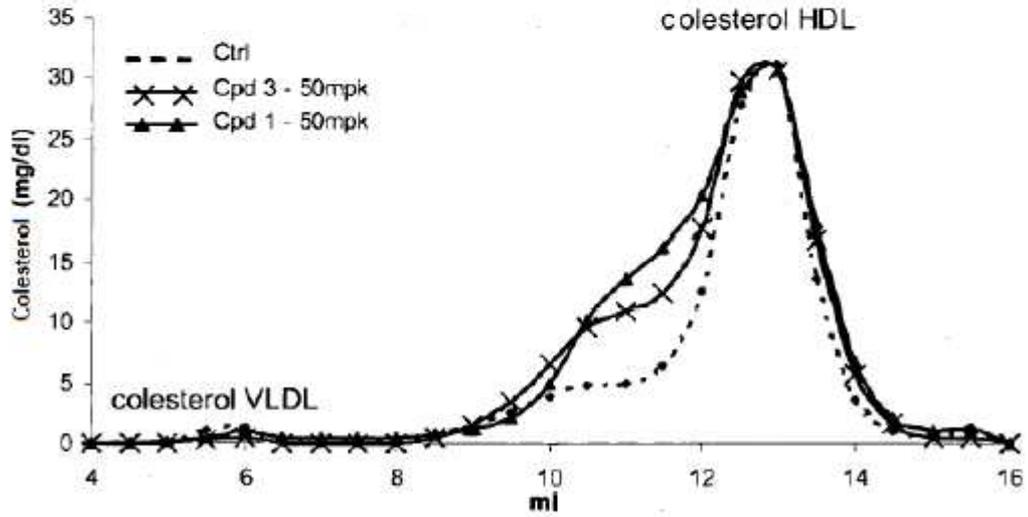


Figura 4-5

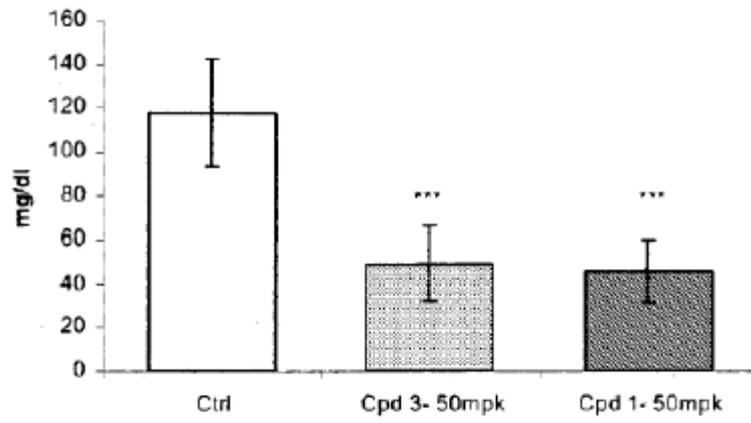


Figura 4-6

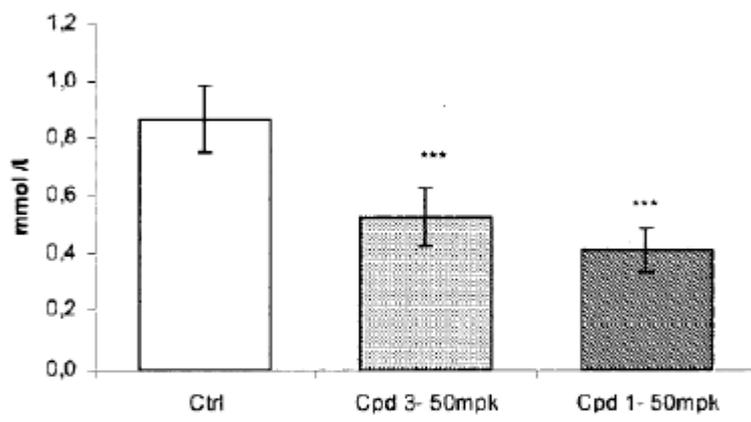


Figura 4-7

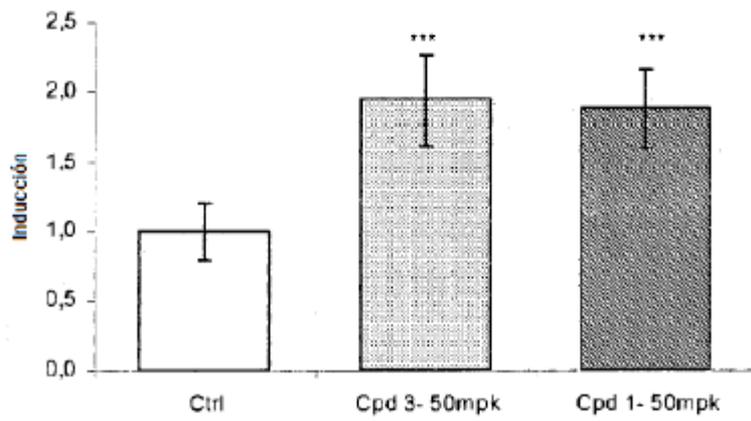


Figura 4-8

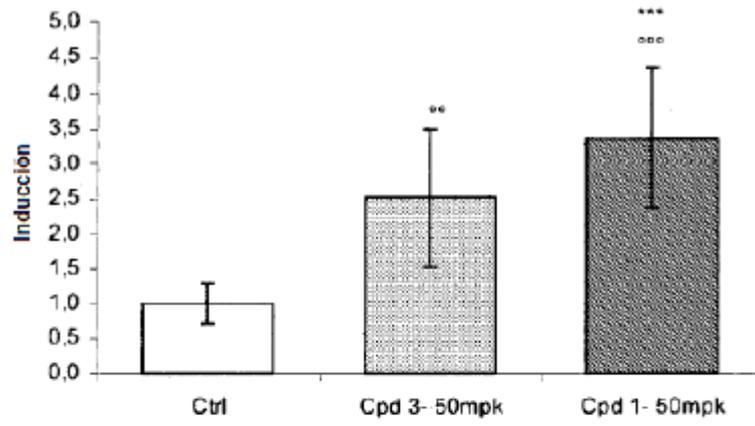


Figura 4-9

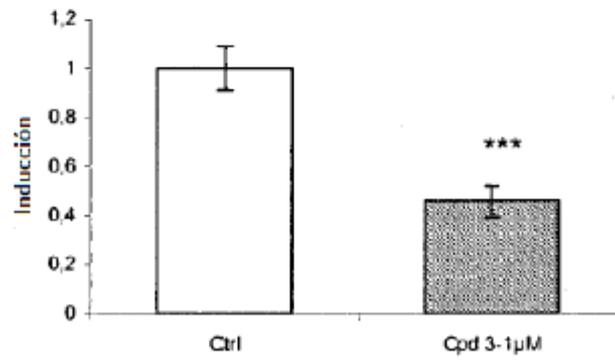


Figura 5