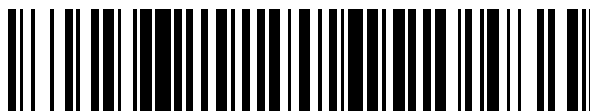


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 260**

51 Int. Cl.:

C07C 229/42 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2006 E 06766085 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1910270**

54 Título: **Compuestos y sus sales específicos de los receptores PPAR y los receptores del EGF, y su uso en el campo de la medicina**

30 Prioridad:

22.07.2005 IT RM20050389

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

30.08.2013

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (100.0%)
33 Sir John Rogerson's Quay
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**NACCARI, GIANCARLO y
BARONI, SERGIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 260 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

Compuestos y sus sales específicos de los receptores PPAR y los receptores del EGF, y su uso en el campo de la medicina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos y a sus sales específicos de los receptores PPAR y los receptores del EGF, y a su uso en el campo de la medicina.

Objetivo de la invención

- 10 En particular, los compuestos y sus sales de acuerdo con la presente invención se pueden usar ventajosamente para la prevención y el tratamiento de tumores que expresan los receptores PPAR γ (receptores activados por proliferadores de peroxisomas) y los receptores del EGF (receptores del factor de crecimiento epidérmico) tales como tumores de: esófago, estómago, páncreas, colon, próstata, mama, útero y apéndices, riñones y pulmones. Por otra parte, los compuestos y sus sales de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, en particular de enfermedades intestinales crónicas tales como la enfermedad de Crohn y la rectocolitis ulcerosa.

Antecedentes de la invención

- 15 Los receptores PPAR γ son receptores nucleares (grupo de aprox. 50 factores de transcripción) que controlan la expresión de muchos genes que son importantes para la regulación del metabolismo de los lípidos, la síntesis de la insulina y los procesos de la carcinogénesis e inflamación. (Bull A. W., *Arch Pathol Lab Med* 2003;127: 1121-1123) (Koeffler H. P., *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1-9) (Youssef J. *et al.*, *J. Biomed Biotech* 2004; 3: 156-166).

- 20 Hay diversos agonistas naturales y sintéticos que se unen a los receptores PPAR γ y alteran su configuración, dando lugar a su activación. En "The Lancet" 2002; 360:1410-1418, se describen ligandos naturales y sintéticos.

- 25 Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de células tumorales con ligandos de los receptores PPAR γ produce una disminución de la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis, lo que sugiere la posible aplicación de dichos compuestos como agentes para la prevención de la carcinogénesis (Osawa E. *et al.*, "Gastroenterology", 2003; 124:361-367).

Otros estudios han demostrado que los ligandos de los receptores PPAR γ (por ejemplo, la troglitazona) tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la respuesta inflamatoria mucosa en modelos animales de la EII (Tanaka T *et al.*, *Cancer Res* 2001; 61: 2424-2428).

- 30 Por otra parte, muy recientemente, se han publicado pruebas de que la actividad antiinflamatoria intestinal de 5-ASA, el patrón de referencia en el tratamiento de la EII, depende de la unión, y la consiguiente activación, de los receptores PPAR γ (Rousseaux C. *et al.*, *J Exp Med* 2005; 201: 1205-1215).

El receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa del EGF se expresa a un nivel muy alto en forma activada en diversos tipos de neoplasias (Mendelsohn J., *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:3-9) (Harari P. M., *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 689-708).

- 35 La sobreexpresión del receptor también está relacionada con la capacidad potencial de las células tumorales para sufrir metástasis. En relación con esto, se ha demostrado que el EGF promueve la migración y la invasión de diversos tipos de células relacionadas con las lesiones a nivel de las interacciones con la matriz extracelular (Brunton *et al.*, "Oncogene" 1997; 14:283-293).

- 40 Numerosos estudios realizados tanto en animales de experimentación como en seres humanos han demostrado la eficacia de los inhibidores del receptor del EGF en el control de la proliferación y la propagación de los tumores (Mendelsohn J., *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:3-9) (Harari P. M., *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:689-708).

- 45 No hay duda de que las señales intracelulares desencadenadas por la activación del receptor del EGF facilitan el crecimiento y la supervivencia de las células neoplásicas, lo que contribuye al desarrollo de la patología, y que dichas señales son esenciales para la determinación de la capacidad de las células tumorales para propagarse y colonizar órganos distantes (Mendelsohn J., *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:3-9) (Kari C *et al.*, *Cancer Res* 2003; 63:1-5).

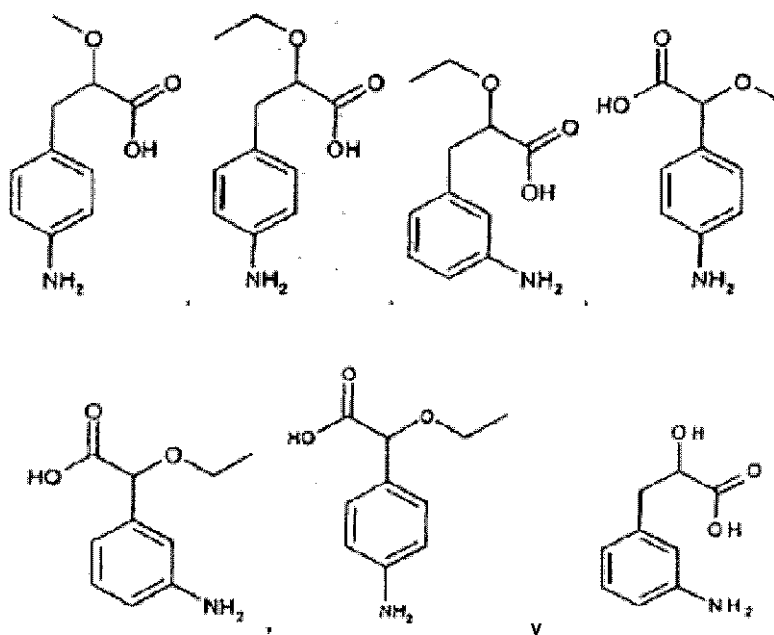
- 50 A partir de lo anterior y teniendo en cuenta, además, que desde el punto de vista biológico, los procesos inflamatorios crónicos desempeñan un papel en la carcinogénesis, es obvio que existe una necesidad real de investigar de manera innovadora nuevas entidades químicas que, por su acción complementaria tanto en los receptores PPAR γ como en los receptores del EGF, sean capaces de ejercer una acción antiinflamatoria y antitumoral de tipo quimio-preventiva, antiproliferativa y antimetastásica.

La presente invención proporciona una nueva clase de compuestos que son adecuados para la prevención y el tratamiento del cáncer y de la inflamación crónica mediante la modulación de receptores específicos tales como los receptores PPAR γ y los receptores del EGF.

Resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos e innovadores usos médicos y terapéuticos de una serie de compuestos. En la medida en que cualquiera de estos compuestos no sea conocido, la invención también se refiere a estos compuestos.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto y sales del mismo seleccionados de entre el grupo que consiste en:



10 Los compuestos de la invención corresponden a los compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste en:

- ácido 3-(3'-aminofenil)2-hidroxi-propanoico (compuesto 20)
- ácido 2-(4-aminofenil)2-metoxiacético (compuesto 23)
- ácido 2-(3-aminofenil)2-etoxiacético (compuesto 32)
- 15 ácido 2-(4-aminofenil)2-etoxiacético (compuesto 33)
- ácido 3-(4'-aminofenil)2-metoxipropiónico (compuesto 34)
- ácido 3-(4'-aminofenil)2-etoxipropiónico (compuesto 39)
- ácido 3-(3'-aminofenil)2-etoxipropiónico (compuesto 40).

20 Los nombres de los compuestos anteriores también se pueden escribir en la nomenclatura química estándar de la siguiente manera (nomenclatura que se usará a lo largo del texto):

- ácido (\pm)-2-hidroxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 20)
- ácido (\pm)-2-metoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 23)
- ácido (\pm)-2-etoxi-2-(3'-aminofenil)acético (compuesto 32)
- ácido (\pm)-2-etoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 33)
- 25 ácido (\pm)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 34)
- ácido (\pm)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 39)

ácido (\pm)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 40).

5 En un segundo aspecto de la invención, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar ventajosamente en el campo de la medicina. Por lo tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según lo definido anteriormente como principios activos en combinación con uno o más excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos según lo definido anteriormente para la preparación de un producto medicinal para la prevención y el tratamiento de tumores que expresen los receptores PPAR γ y los receptores del EGF tales como, por ejemplo, tumor de esófago, estómago, páncreas, colon, próstata, mama, útero y sus apéndices, riñón y pulmón.

10 Además, la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención para la preparación de un producto medicinal para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas tales como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la rectocolitis ulcerosa.

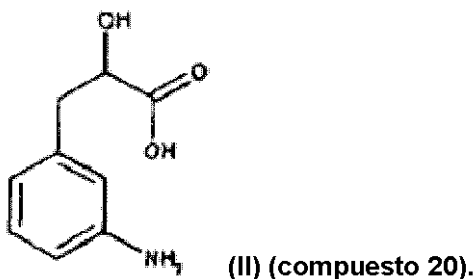
En otro aspecto más de la invención, otros compuestos adicionales que se pueden usar en las aplicaciones anteriormente mencionadas, al margen de los que ya se han descrito, pueden ser los siguientes:

15 ácido (*R,S*)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 21) y
 ácido (*R,S*)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 35).

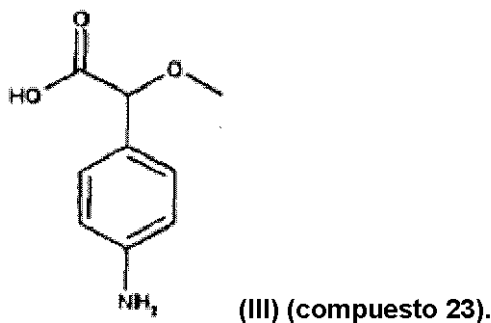
Los nombres de los compuestos anteriores también se pueden escribir en la nomenclatura química estándar de la siguiente manera (nomenclatura que se usará a lo largo del texto):

20 ácido (\pm)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 21) y
 ácido (\pm)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 35).

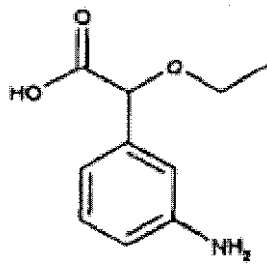
Un compuesto preferido tiene la fórmula (II):



Un compuesto preferido tiene la fórmula (III):

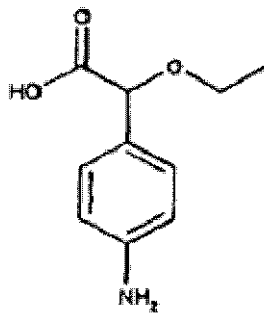


25 Un compuesto preferido tiene la fórmula (IV):



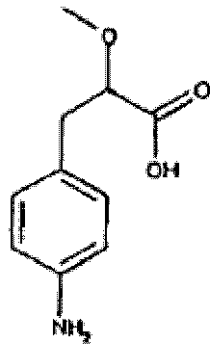
(IV) (compuesto 32).

Un compuesto preferido tiene la fórmula (V):



(V) (compuesto 33).

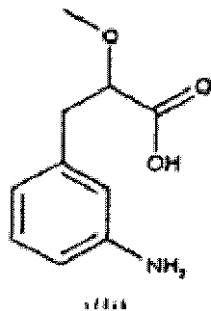
Un compuesto preferido tiene la fórmula (VI):



(VI) (compuesto 34).

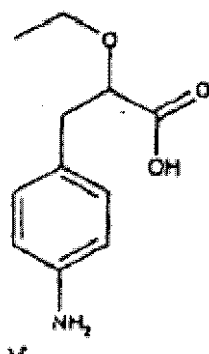
5

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el compuesto y las sales del mismo que tienen fórmula (VII) se pueden usar en el campo de la medicina.



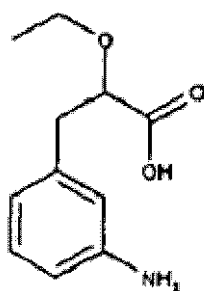
(VII) (compuesto 35).

Un compuesto preferido tiene la fórmula (VIII):



(VIII) (compuesto 39).

Un compuesto preferido tiene la fórmula (IX):



(IX) (compuesto 40).

Los compuestos preferidos de la invención se pueden seleccionar de entre el grupo que consiste en:

- 5 ácido (±)-2-hidroxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 20)
- ácido (±)-2-metoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 23)
- ácido (±)-2-etoxi-2-(3'-aminofenil)acético (compuesto 32)
- ácido (±)-2-etoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 33)
- ácido (±)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 34)
- 10 ácido (±)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 39)
- ácido (±)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 40).

Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar ventajosamente en el campo de la medicina. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según lo definido anteriormente como principios activos en combinación con uno o más excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos según lo definido anteriormente para la preparación de un producto medicinal para la prevención y el tratamiento de tumores que expresen los receptores PPAR γ y los receptores del EGF tales como, por ejemplo, tumor de esófago, estómago, páncreas, colon, próstata, mama, útero y sus apéndices, riñón y pulmón.

Además, la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención para la preparación de un producto medicinal para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas tales como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la rectocolitis ulcerosa. La presente invención se refiere además a procedimientos de tratamiento de seres humanos y/o mamíferos (incluyendo roedores, animales de granja, animales domésticos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, caballos).

En particular, los compuestos de acuerdo con la invención que se pueden usar en las aplicaciones anteriormente mencionadas, al margen de las que ya se han descrito, pueden ser los siguientes:

- ácido (±)-2-hidroxi-2-(3-aminofenil)acético (compuesto 10)
- ácido (±)-2-hidroxi-2-(4-aminofenil)acético (compuesto 11)
- ácido (±)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 21)

ácido (\pm)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 35)

ácido (\pm)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 34).

5 Los usos de los compuestos descritos no se limitan a su uso en la forma racémica. La presente invención engloba el uso de cualquiera de los compuestos descritos en las formas enantioméricamente puras *R* o *S*, o en cualquier mezcla en la que un enantiómero esté en exceso con respecto al otro, en cualquier proporción.

De hecho, los estudios de acoplamiento realizados indican que el enantiómero *S* es más activo que el enantiómero *R*, aunque el enantiómero *R* puro no muestra actividad.

10 Las moléculas de la presente invención se obtuvieron mediante un trabajo de modelización molecular usando mesalazina como patrón de referencia, y se evaluaron todas las variaciones químicamente viables para lograr la mejor puntuación (afinidad y activación del receptor) en los experimentos de acoplamiento por ordenador. Por consiguiente, se cree que los compuestos de la presente invención que muestran una función y/o actividad comparables con la mesalazina lo hacen a través de rutas biológicas similares. Se cree que las características similares a mesalazina inherentes a las moléculas de la invención confieren a las moléculas una actividad similar en relación con la ruta del EGF.

15 Los ejemplos proporcionados en la presente memoria son modelos útiles para su uso en la predicción del uso de los compuestos en los diversos campos de la medicina ya descritos. Por tanto, los modelos proporcionan resultados valiosos y significativos, independientemente de su mecanismo de acción.

A continuación, se describirá la presente invención a efectos ilustrativos, pero no restrictivos, de acuerdo con sus realizaciones preferidas, haciendo referencia particularmente a los diagramas de las figuras adjuntas.

20 **Breve descripción de las figuras y la tabla**

Tabla 1. Porcentajes de la inhibición de células DLD-1 en dosis graduadas (0,5-10 mM) de los compuestos especificados. Se cultivaron las células en presencia o en ausencia de los compuestos y luego se evaluó el crecimiento celular mediante el ensayo colorimétrico (BrdU) tras un cultivo de 48 horas.

Figura 1: muestra las estructuras de los compuestos 20, 23, 32, 33, 34, 35, 39 y 40.

25 Figura 2: actividad de PPAR γ mediante el tratamiento con compuestos.

Figuras 3-4: efecto de las sustancias especificadas en la proliferación de líneas celulares de carcinoma de colon humano (es decir, HT29, HT115 y DLD1). Las células se trataron con concentraciones crecientes de sustancias (0,5-10 mM) durante 48 horas y la proliferación se determinó usando un ensayo colorimétrico para la medición de la incorporación de BrdU. La densidad óptica (DO) se determinó a 450 nm usando un lector de ELISA. Los datos indican la media \pm DE de 3 experimentos separados.

30 Figura 5: Acoplamiento del Compuesto 34 (*R*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

Figura 6: Acoplamiento del Compuesto 34 (*S*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

35 Figura 7: Acoplamiento del Compuesto 35 (*R*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

Figura 8: Acoplamiento del Compuesto 35 (*S*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

40 Figura 9: Acoplamiento del Compuesto 39 (*R*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

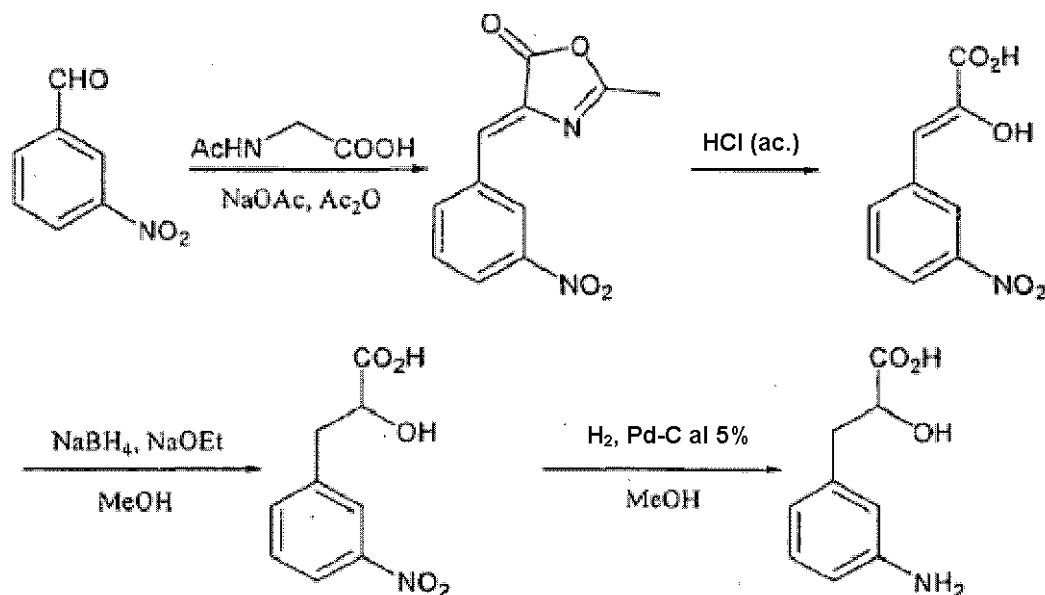
Figura 10: Acoplamiento del Compuesto 39 (*S*) al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

Figura 11: Acoplamiento de la mesalamina al receptor PPAR γ (se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno).

45 Figura 12: Síntesis esquemática y posterior resolución del Compuesto 39.

Ejemplo 1

Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-hidroxi-3-(3'-aminofenil)-propanoico (Compuesto 20)



Etapa 1

- 5 Se mezclaron 3-nitro-benzaldehído (45,3 g, 0,3 mol), *N*-acetilglicina (42,1 g, 0,36 mol) y acetato de sodio (32 g, 0,39 mol) con anhídrido acético (142 ml, 1,5 mol), y se calentó la mezcla resultante con agitación a 120 °C durante 6 horas, dando una solución de color oscuro. Después, se enfrió la mezcla hasta la T.A. durante una noche, dando como resultado la formación de un sólido precipitado. Se vertió la mezcla de reacción en agua con hielo (130 g) y se recogió por filtración el sólido suspendido resultante. Se lavó el producto sólido en bruto (72 g) con acetona (80 ml),
 10 después se recristalizó en acetona caliente (320 ml), dando un sólido cristalino que se lavó con etanol acuoso al 50 % que luego se secó a 40 °C/5,3 kPa, dando 2-metil-4-(3-nitrobenciliden)oxazol-5(4*H*)-ona (49,0 g, 78 %) en forma de agujas de color amarillo pálido. RMN de ¹H (δ, 250 MHz, CDCl₃) = 2,47 (3H, s), 7,15 (1H, s), 7,63 (1H, dd, 8,2 y 7,6 Hz), 8,27 (1H, d, 8,2 Hz), 8,34 (1H, d, 7,6 Hz), 9,02 (1H, s).

Etapa 2

- 15 Se mezcló 2-metil-4-(3-nitrobenciliden)oxazol-5(4*H*)-ona (52,0 g, 0,224 mol) con ácido clorhídrico 3 M (1,3 l) y se agitó la suspensión a 100 °C durante 6 h. Se agitó la suspensión resultante a T.A. durante una noche y después se recogió el sólido suspendido por filtración, se lavó con agua (2 x 40 ml), y luego se secó al vacío, dando ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrílico (29,3 g). Se extrajeron el filtrado combinado y los lavados con acetato de etilo (4 x 0,5 l), después se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio y se concentraron hasta la sequedad, dando un cultivo adicional de ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrílico (12,0 g). El rendimiento total del ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrílico fue de 41,3 g (88 %).

RMN de ¹H (δ, 250 MHz, DMSO-d₆) = 6,56 (1H, s), 7,64 (1H, t, 8Hz), 8,0-8,1 (2H, m), 8,78 (1H, s), 9,95 (1H, s ancho), 12,80 (1H, s ancho).

Etapa 3

- 25 Se añadió etóxido de sodio (1,8 g, 26,4 mmol) en porciones a 0 °C a una solución agitada de ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrílico (5,25 g, 25,0 mmol) en metanol (131 ml) para formar una solución de color amarillo pálido, transparente. A continuación, se añadió borohidruro de sodio (1 g, 26,4 mmol) cuidadosamente en dos porciones, y se agitó la mezcla a 5-10 °C durante 30 minutos. Después se añadió una pequeña cantidad de agua para detener la reacción y destruir cualquier exceso de NaBH₄. Se eliminó el metanol al vacío, dando un residuo sólido que se trituró
 30 con una mezcla a 5:2 de acetato de etilo y heptano (21 ml), luego se siguió moliendo con metanol acuoso al 3 %. Se recogió el sólido resultante por filtración y se secó al vacío, dando ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propiónico (3,0 g, 57 %).

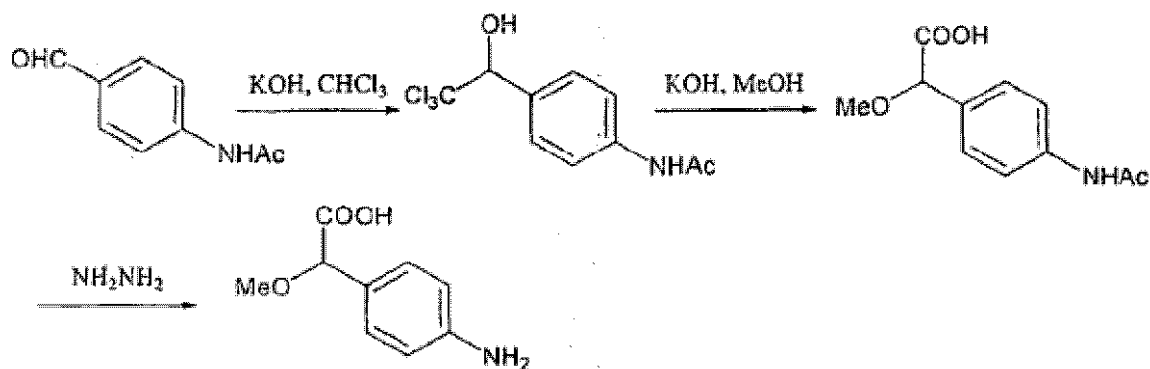
RMN de ¹H (δ, 250 MHz, DMSO-d₆) = 2,97 (1H, dd, 14 y 8,2 Hz), 3,15 (1H, dd, 14 y 4,2 Hz), 4,23 (1H, dd, 8,2 y 4,2 Hz), 7,58 (1H, t, 8Hz), 7,70 (1H, d, 8Hz), 8,0-8,15 (2H, m).

35

Etapa 4

Se hidrogenó una mezcla de ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propiónico (3,0 g, 14,2 mmol), metanol (129 ml) y paladio sobre carbón vegetal activado al 5 % (600 mg, 2 % molar) en una atmósfera de H₂ de 68,9 kPa durante 1 h. Después, se filtró la mezcla a través de celita, se lavó la torta de filtro con metanol y se concentraron los filtrados a 40 °C bajo un alto vacío, dando el producto en forma de un sólido espumoso. Se disolvió este en agua y se liofilizó la solución, dando ácido (±)-2-hidroxi-3-(3'-amino-fenil)-propanoico (2,6 g, 100 %) en forma de un sólido blanco.

RMN de ¹H (δ, 250 MHz, DMSO-d₆) = 2,61 (1H, dd, 13,6 y 8,3 Hz), 2,81 (1H, dd, 13,6 y 4,6 Hz), 4,09 (1H, dd, 8,25 y 4,6 Hz), 6,35-6,43 (2H, m), 6,45 (1H, d, 1Hz), 6,90 (1H, t, 7,6 Hz).

Ejemplo 2**10 Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-metoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 23)****Etapa 1**

Se añadió una solución de hidróxido de potasio (6,72 g, 0,12 mol) en metanol (25 ml) a una solución enfriada (-7 °C) de 4-acetamidobenzaldehído (24,5 g, 0,15 mol) y cloroformo (40,1 g, 0,33 mol) en DMF (100 ml) a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de -5 °C. Se dejó calentar la mezcla hasta 2 °C durante 5,5 h, y luego se añadió a una mezcla de HCl ac. 1 M (200 ml) y tolueno (200 ml), y se agitó durante la noche. Se recogió el 2-(4-acetamidofenil)-triclorocarbinoles resultante por filtración (29 g) y secó por succión.

Etapa 2

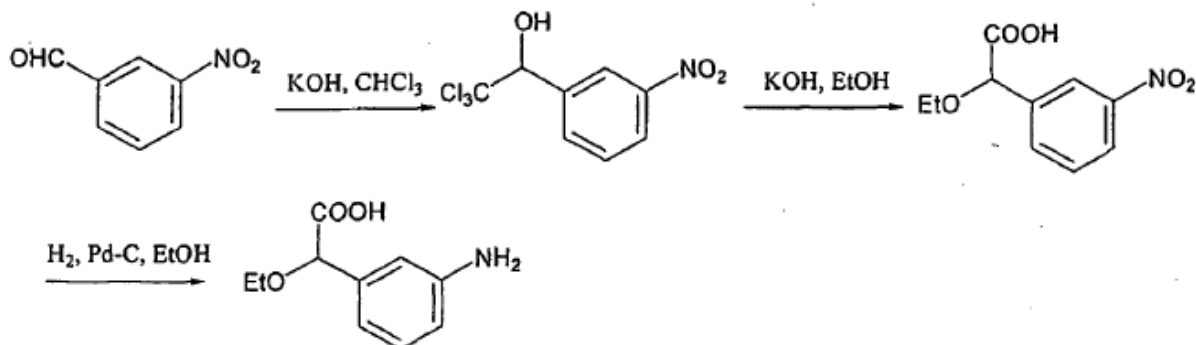
Se combinaron soluciones de 2-(4-acetamidofenil)-triclorocarbinoles (14,0 g, 49,5 mmol) en metanol (330 ml) e hidróxido de potasio (13,8 g, 250 mmol) en metanol (150 ml), y se calentó la mezcla hasta 70-80 °C durante 3 h. Después de enfriar, se retiró el subproducto de KCl por filtración y, luego, la concentración del filtrado al vacío dio ácido 2-(4-acetamidofenil)-2-metoxiacético (14 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 3

Se calentó ácido 2-(4-acetamidofenil)-2-metoxiacético (7,1 g, 31,8 mmol) con monohidrato de hidrazina (40 ml) durante 16 horas, y se enfrió y se concentró al vacío. Se purificó el aceite residual resultante mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: metanol al 20-40 % en CH₂Cl₂), dando 2,6 g (45 %) de ácido (±)-2-metoxi-2-(4'-aminofenil)-acético. RMN de ¹H (δ, 250 MHz, CD₃OD): 3,27 (3H, s), 4,43 (1H, s), 6,66 (2H, d, 8,5 Hz), 7,18 (2H, d, 8,2 Hz).

Ejemplo 3

Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-metoxi-2-(3'-aminofenil)acético (compuesto 32)



Etapa 1

- 5 Se disolvieron 3-nitrobenzaldehído (25 g, 165 mmol) y cloroformo (30 ml, 375 mmol) en DMF (100 ml) y se enfrió la solución hasta entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añadió una solución recién preparada de hidróxido de potasio (7,5 g, 134 mmol) en metanol (22,5 ml) lentamente para mantener la temperatura interna por debajo de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mantuvo la reacción por debajo de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas y después se detuvo con una mezcla enfriada de ácido clorhídrico acuoso (225 ml) en tolueno (225 ml). Se dejó calentar la solución lentamente hasta la temperatura ambiente durante la noche en el baño de hielo. Tras este tiempo, se separó la capa de tolueno y se extrajo además la capa acuosa con tolueno. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua (2 x 225 ml), solución de bicarbonato de sodio al 5 % (225 ml) y agua (225 ml). Se secó la solución (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío, dando 2-(3-nitrofenil)-triclorocarbinoles en forma de un sólido naranja (42 g, 155 mmol, 94 %).

15 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, CDCl_3): 3,7 (s ancho, 1H), 5,4 (s, 1H), 7,6 (t, 1H, 8,0 Hz), 8,0 (d, 1H, 8,0 Hz), 8,3 (d, 1H, 8,0 Hz), 8,5 (s, 1H).

Etapa 2

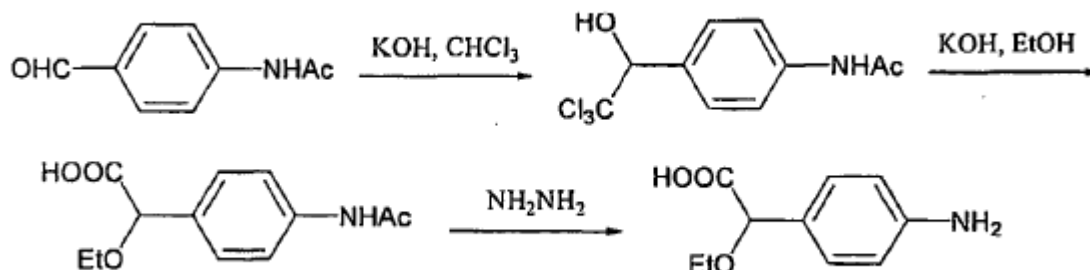
- 20 Se disolvió 2-(3-nitrofenil)-triclorocarbinoles (20 g, 74 mmol) en etanol absoluto (74 ml) y se añadió lentamente una solución de hidróxido de potasio (20,7 g, 369 mmol) en etanol absoluto (150 ml). Se calentó la solución a reflujo durante 4 horas, se dejó enfriar y después se concentró al vacío. Se acidificó el residuo con ácido clorhídrico diluido y se extrajo el producto en acetato de etilo (x 3). Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 2-etoxi-2-(3-nitrofenil)acético en forma de un sólido de color marrón (6,4 g, 28,4 mmol, 38 %).

RMN de ^1H (δ , 250 MHz, CD_3OD): 1,0 (t, 3H, 7,0 Hz), 3,6 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 5,1 (s, 1H), 7,7 (t, 1H, 7,8 Hz), 7,9 (d, 1H, 7,8 Hz), 8,3 (d, 1H, 7,8 Hz), 8,4 (s, 1H).

Etapa 3

- 25 Se disolvió ácido 2-etoxi-2-(3-nitrofenil)acético (6,4 g, 28,4 mmol) en etanol absoluto (500 ml), se añadió paladio sobre carbón al 5 % (húmedo) (1,5 g) y se hidrogenó la mezcla a 413,7 kPa durante una noche. Se filtró la suspensión a través de celita y se concentró el filtrado, dando ácido (±)-2-etoxi-2-(3'-amino-fenil)-acético (3,0 g, 15,3 mmol, 54 %) en forma de un sólido de color marrón.

30 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, CD_3OD): 1,2 (t, 3 H, $J = 6,9$ Hz), 3,5 (m, 1 H), 3,6 (m, 1 H), 4,6 (s, 1 H), 6,7 (d, 1 H, $J = 7,6$ Hz), 6,9 (m, 2 H), 7,0 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz).

Ejemplo 4**Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-etoxi-2-(4'-aminofenil)-acético (Compuesto 33)***Etapa 1*

- 5 Véase el "Compuesto 23, etapa 1".

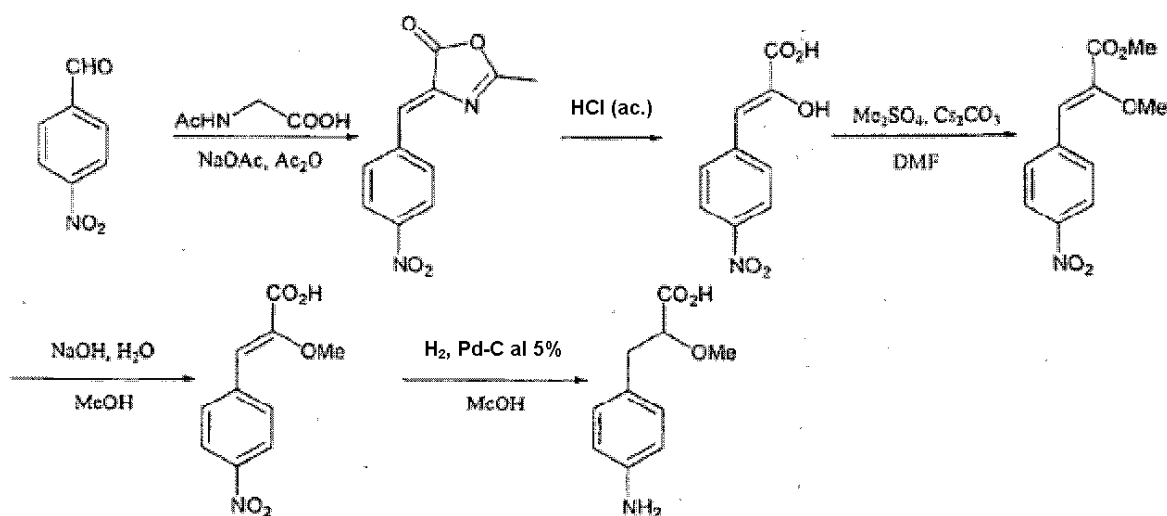
Etapa 2

- 10 Se combinaron soluciones de 2-(4-acetamidofenil)-triclorocarbinoil (14,0 g, 49,5 mmol) en etanol (400 ml) e hidróxido de potasio (13,8 g, 250 mmol) en etanol (150 ml), y se calentó la mezcla a 70-80 °C durante 2,5 horas. Se enfrió la mezcla, se filtró para eliminar el subproducto de KCl y se concentró al vacío, dando ácido 2-(4-acetamidofenil)-2-etoxiacético (14 g) en forma de un sólido amarillo.

Etapa 3

- 15 Se calentó ácido 2-(4-acetamidofenil)-2-etoxiacético (7,54 g, 31,8 mmol) con monohidrato de hidrazina (40 ml) durante 16 horas, se enfrió la mezcla y después se concentró al vacío. Se purificó el aceite residual mediante cromatografía en columna de sílice (eluyente de metanol al 20-40 % en CH₂Cl₂), dando ácido (±)-2-etoxi-2-(4'-aminofenil)-acético (2,3 g, 37 %) en forma de una espuma blanca.

RMN de ¹H (δ, 250 MHz, CD₃OD): 1,18 (3H, t, 7,0 Hz), 4,42 (1H, c, 7,3, 2,4 Hz), 4,56 (2H, s), 5,50 (1H, c, 7,0; 2,1 Hz), 6,66 (2H, d, 8,7 Hz), 7,20 (2H, d, 8,5 Hz).

Ejemplo 5**Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)-propiónico (Compuesto 34)**

20

Etapa 1

Se mezclaron 4-nitro-benzaldehído (53,7 g, 0,356 mol), N-acetilglicina (49,9 g, 0,427 mol) y acetato de sodio (37,9 g, 0,463 mol) con anhídrido acético (168 g, 1,78 mol) y se calentó la mezcla resultante con agitación a 120 °C durante 6

horas, dando una suspensión de color oscuro. Después, se enfrió la mezcla hasta la T.A. durante una noche, dando como resultado la formación de un sólido precipitado. Se vertió la mezcla de reacción en agua con hielo (150 g) y se recogió el sólido suspendido resultante por filtración. Se lavó el producto sólido en bruto con acetona (100 ml), después se recristalizó en acetona caliente (650 ml), dando un sólido cristalino que se lavó con etanol acuoso al 50 %
5 que después se secó al vacío, dando 2-metil-4-(4-nitrobenciliden)oxazol-5(4H)-ona (55,0 g, 66 %) en forma de agujas de color amarillo pálido. Se combinaron los licores madre de cristalización y los lavados, y se evaporaron, dando un residuo sólido que se recristalizó en acetona, dando una segunda cosecha de 2-metil-4-(4-nitrobenciliden)oxazol-5(4H)-ona (8 g, 10 %). El rendimiento combinado de 2-metil-4-(4-nitrobenciliden)oxazol-5(4H)-ona fue de 63 g (76 %).

10 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, CDCl_3) = 2,47 (3H, s), 7,14 (1H, s), 8,28 (4H, m).

Etapa 2

Se mezcló 2-metil-4-(4-nitrobenciliden)oxazol-5(4H)-ona (63,0 g, 0,272 mol) con ácido clorhídrico 3 M (1,2 l) y se agitó la suspensión a 100 °C durante 6 h. Se agitó la suspensión resultante a T.A. durante una noche y después se recogió el sólido suspendido por filtración, se lavó con agua (2 x 50 ml), y después se secó al vacío, dando ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (46,6 g, 81 %). Se extrajeron el filtrado combinado y los lavados con acetato de etilo (4 x 0,5 l), después se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio y se concentraron hasta la sequedad, dando una cosecha adicional de ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (0,8 g, 1 %). El rendimiento total del ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrílico fue de 47,4 g (82 %).

RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6) = 6,52 (1H, s), 8,01 (2H, d, 8,5 Hz), 8,22 (2H, d, 8,5 Hz).

20 *Etapa 3*

Se agitó una mezcla de ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (15 g, 71,7 mmol), carbonato de cesio (56 g, 172,1 mmol) y sulfato de dimetilo (14,2 ml, 150,6 mmol) en DMF (270 ml) a T.A. durante 18 horas. Se añadieron agua (220 ml) y acetato de etilo (150 ml), y se separaron las capas. Se extrajo además la capa acuosa con acetato de etilo (4 x 100 ml) y luego se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua (6 x 100 ml), salmuera (2 x 120 ml) y se concentraron hasta la mitad del volumen. Se añadió heptano (70 ml) y se concentró la mezcla hasta 200 ml de volumen. Se recogió el sólido precipitado resultante por filtración, se lavó con heptano (2 x 100 ml) y se secó por succión sobre el filtro, dando 2-metoxi-3-(4-nitrofenil)acrilato de metilo en forma de un sólido de color tostado (9,2 g, rendimiento del 54 %) que contenía una traza de heptano.

30 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 3,82 (s, 3-H, OMe), 3,84 (s, 3-H, OMe), 7,02 (s, 1-H, CH=), 8,04 (d, 2-H, CH aromático), 8,26 (d, 2-H, CH aromático).

Etapa 4

Se disolvió 2-metoxi-3-(4-nitrofenil)acrilato de metilo (7,8 g, 32,8 mmol) en IMS (156 ml). Se añadió una solución de NaOH (1,44 g, 36,1 mmol) en agua (78 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente (18 °C) durante 18 horas. Se acidificó la mezcla de reacción con HCl 1 M (120 ml) y se recogió el sólido precipitado resultante por filtración, se lavó con agua (2 x 100 ml) y se secó parcialmente mediante succión sobre el filtro durante 30 minutos, seguido del secado en horno al vacío a 18 °C durante 18 horas. Por lo tanto se proporcionó 2-metoxi-3-(4-nitrofenil)acrílico en forma de un sólido de color tostado que contenía un poco de agua de cristalización (6,7 g, 91 %).

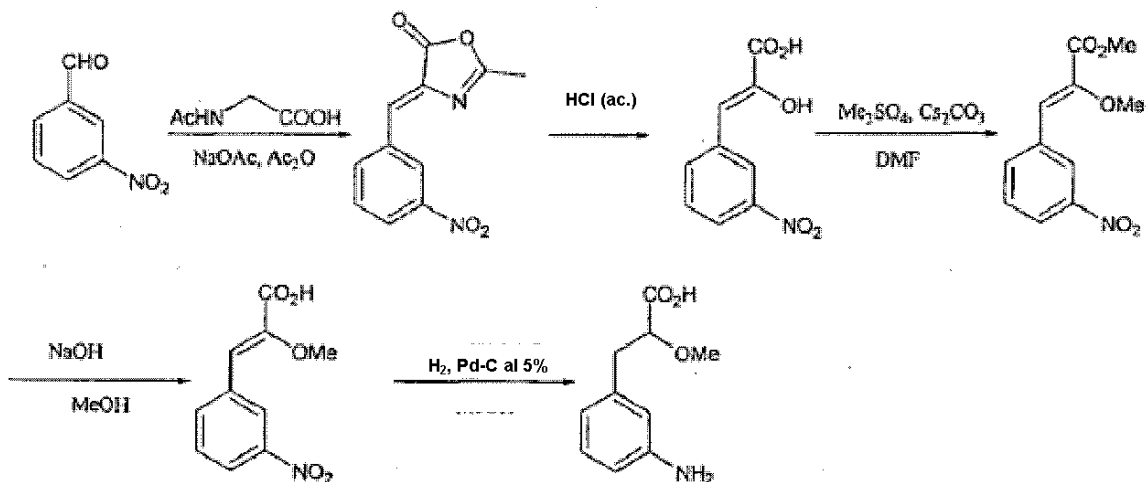
RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 3,83 (s, 3-H, OMe), 6,97 (s, 1-H, CH=), 8,02 (d, 2-H, CH aromático), 8,25 (d, 2-H, CH aromático).

40 *Etapa 5*

Se recogió ácido 2-metoxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (6,7 g, 30 mmol) en metanol (700 ml) y THF (300 ml), y se añadió Pd sobre C al 10 % (base húmeda) (0,67 g). Se hidrogenó la mezcla a 310,26 kPa durante 43 min, seguido de recargas repetidas a 310,26-330,94 kPa por hora durante 3 horas y, finalmente, a 330,94 kPa durante 18 horas. Se filtró la suspensión resultante a través de papel filtrante GF/F y se lavó el residuo de filtración con MeOH (200 ml). Se concentraron los filtrados, dando un sólido de color blanquecino. Se suspendió el sólido en IMS (75 ml) a 20 °C durante 1,5 horas, se filtró y se lavó con IMS/heptano (1:2) (20 ml) y se secó en el filtro durante 1 hora, proporcionando ácido (\pm)-2-metoxi-3-(4'-amino-fenil)-propiónico en forma de un sólido de color blanquecino (5,1 g, rendimiento del 88 %).

50 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 2,74 (m, 2-H), 3,23 (s, 3-H, CH_3), 3,80 (dd, 1-H, CH); 6,47 (d, 2-H, aromático), 6,87 (d, 2-H, aromático).

Ejemplo 6

Procedimiento de preparación de ácido (\pm)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)-propiónico (Compuesto 35)

Etapas 1 y 2

5 Como en el Compuesto 20.

Etapas 3

10 Se añadió sulfato de dimetilo (13,23 g, 105 mmol) a una mezcla agitada de ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrilico (10,5 g, 50,0 mmol) y carbonato de cesio (39,1 g, 120 mmol) en DMF (105 ml) para formar una mezcla de color amarillo pálido transparente, que se agitó a T.A. durante una noche. Se concentró la suspensión de color rojo oscuro resultante al vacío y se repartió el residuo entre agua (100 ml) y diclorometano (150 ml). Se separó la capa orgánica, se lavó después con agua (2 x 100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se filtró a través de gel de sílice. Se evaporó la solución amarilla resultante hasta la sequedad al vacío, dando clorhidrato de 2-metoxi-3-(3-nitrofenil)acrilato en forma de un sólido amarillo (8,1 g, 67 %). RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6) = 3,81 (3H, s), 3,83 (3H, s), 7,08 (1H, s), 7,71 (1H, dd, 7,9 y 8,2 Hz), 8,10-8,22 (2H, m), 8,66 (1H, s).

15 Etapas 4

20 Se añadió una solución de hidróxido de potasio (2,0 g, 35,9 mol) en agua (25 ml) a una solución agitada de 2-metoxi-3-(3-nitrofenil)acrilato de metilo (8,1 g, 34,2 mmol) en metanol (150 ml) y se agitó la mezcla resultante a T.A. durante la noche. Se añadió una cantidad adicional de KOH (0,5 g, 8,9 mmol) en agua (10 ml) y se calentó la mezcla hasta 80 °C durante 1 hora. Después, se evaporó el metanol al vacío y se diluyó el residuo con agua (200 ml). Se lavó la solución con diclorometano (2 x 100 ml), se filtró a través de un lecho corto de celita y después se acidificó mediante la adición de HCl 3 M a pH 3. Se refrigeró la mezcla durante 18 h y después se recogió el sólido precipitado por filtración, se lavó con agua (3 x 30 ml) y se secó al vacío a 40 °C, dando ácido 2-metoxi-3-(3-nitrofenil)acrilico en forma de un sólido de color amarillo (6,4 g, 84 %).

25 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6) = 3,82 (3H, s), 7,02 (1H, s), 7,70 (1H, t, 7,93 Hz), 8,10-8,22 (2H, m), 8,65 (1H, s).

Etapas 5

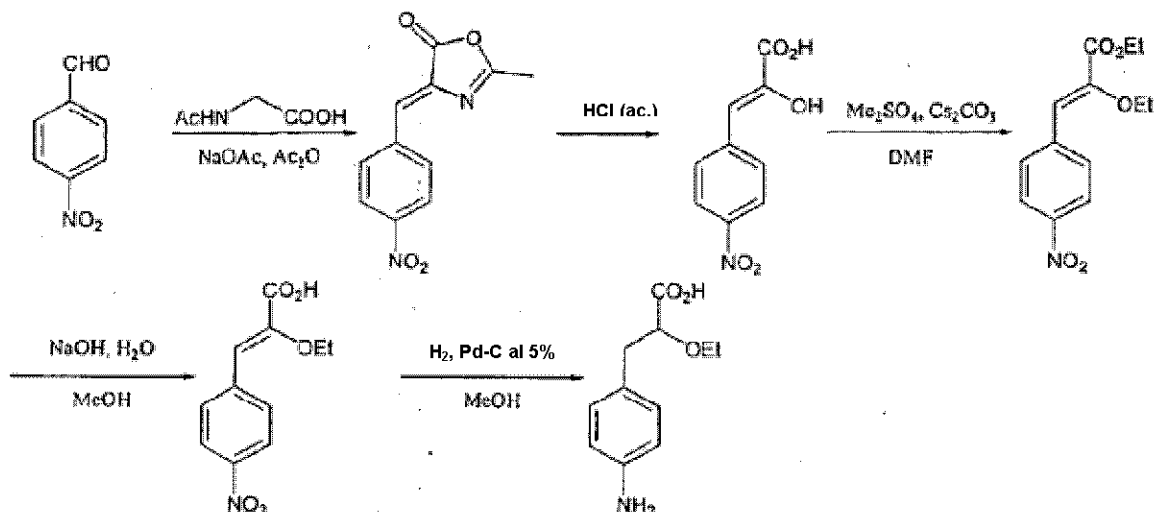
30 Se hidrogenó una mezcla de ácido 2-metoxi-3-(3-nitrofenil)acrilico (3,4 g, 15,25 mmol), metanol (340 ml) y paladio sobre carbón vegetal activado al 5 % (1,36 g, 4 % molar) en una atmósfera de H_2 de 82,74-248,21 kPa durante 1,5 h. Después, se filtró la mezcla a través de celita, se lavó la torta de filtro con metanol y se concentraron los filtrados a 40 °C bajo un alto vacío, dando el producto en forma de un sólido espumoso. Se disolvió este en agua (100 ml) y se liofilizó la solución, dando ácido (\pm)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)-propiónico (2,6 g, 100 %) en forma de un sólido blanquecino.

RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6) = 2,68 (1H, dd, 13,9 y 8 Hz), 2,80 (1H, dd, 13,9 y 4,6 Hz), 3,21 (3H, s), 3,84 (1H, dd, 8,25 y 4,6 Hz), 6,36-6,44 (3H, m), 6,91 (1H, dd, 7,6 Hz).

35

Ejemplo 7

Procedimiento de preparación de ácido (\pm)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil)-propiónico (Compuesto 39). Resolución enantiomérica (Figure 12)



5 Etapas 1 y 2

Como para el compuesto 34, etapas 1 y 2.

Etapa 3

Se suspendió ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (20 g, 95,6 mmol) en DMF (200 ml). Se añadieron Cs_2CO_3 (74,9 g, 229,9 mmol) y sulfato de dietilo (26,3 ml, 201 mmol), y se observó la disolución. Después de agitar durante 18 horas a 18 °C, se añadieron agua (350 ml) y acetato de etilo (250 ml), y se separaron las capas. Se extrajo además la capa acuosa con acetato de etilo (5 x 200 ml) y luego se lavaron los orgánicos combinados con agua (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml), y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se concentraron los compuestos orgánicos hasta la sequedad, obteniéndose acetato de 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)acrilato en forma de un sólido de color naranja que contenía 3,6 % en masa de DMF (27,6 g húmedo, rendimiento de >100 %). RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 1,32 (t, 6-H, 2 x CH_2CH_3), 4,13 (c, 2-H, CH_2CH_3), 4,30 (c, 2-H, CH_2CH_3), 6,99 (s, 1-H, CH=), 8,06 (d, 2-H, CH aromático), 8,26 (d, 2-H, CH aromático).

Etapa 4

Se disolvió 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)acrilato de etilo que contenía 3,6 % en peso de DMF (26,07 g corregidos, 98,3 mmol) en IMS (500 ml), y se añadió una solución de NaOH (1,44 g, 36,1 mmol) en agua (260 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 18 horas, y luego se acidificó con HCl 1 M (120 ml) y se recogió el sólido resultante por filtración, se lavó con agua (2 x 100 ml) y secó por succión sobre el filtro durante 30 minutos, seguido de un secado en horno al vacío a 18 °C durante 18 horas. De ese modo, se obtuvo ácido 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)acrílico en forma de un sólido de color naranja que contenía agua de cristalización (18,4 g, 79 %).

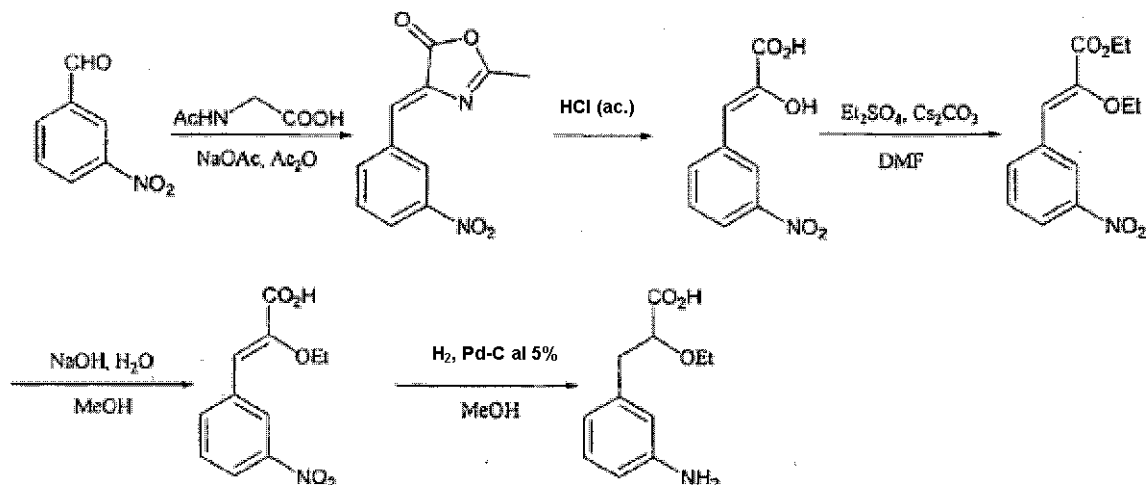
RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 1,31 (t, 3-H, Me), 4,11 (c, 2-H, CH_2), 6,98 (s, 1-H, CH=), 8,05 (d, 2-H, CH aromático), 8,25 (d, 2-H, CH aromático).

Etapa 5

Se disolvió ácido 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)acrílico (18,4 g húmedo, aprox. 77,5 mmol) en MeOH (1,1 l) y se añadió Pd sobre C al 10 % (base húmeda) (1,84 g). Se hidrogenó la mezcla a 82,74 kPa durante 10 minutos, seguido de una recarga repetida a 137,89-193,05 kPa cada 10-20 minutos durante 5 h, y luego a 317,16 kPa durante 18 horas. Se filtró la mezcla a través de papel GF/F y se suspendió el residuo en IMS (100 ml), se filtró, se lavó con heptano (100 ml) y se secó por succión sobre el filtro. Por lo tanto, se obtuvo ácido (+)-2-metoxi 3-(4'-aminofenil)-propiónico en forma de un sólido de color blanco (11,2 g, 69 %).

RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO-d_6): 1,03 (t, 3-H, CH_3), 2,73 (m, 2H), 3,29 (m, 1H), 3,46 (m, 1H), 3,80 (dd, 1H), 6,50 (d, 2-H), 6,87 (d, 2-H).

35

Ejemplo 8**Procedimiento de preparación de ácido (±)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil)-propiónico (Compuesto 40)****Etapas 1 y 2**

- 5 Como para el compuesto 20, etapas 1 y 2.

Etapas 3

- 10 Se añadió sulfato de dietilo (12 g, 78,2 mmol) a una mezcla agitada de ácido 2-hidroxi-3-(3-nitrofenil)acrilico (6,1 g, 30,0 mmol) y carbonato de cesio (29,3 g, 90 mmol) en DMF (61 ml) para formar una mezcla de color amarillo pálido transparente, que se agitó a T.A. durante una noche. Se calentó la suspensión de color rojo oscuro resultante hasta 50°C durante 4 h, luego se concentró al vacío y se repartió el residuo entre agua (100 ml) y diclorometano (150 ml). Se separó la capa orgánica, se lavó después con agua (2 x 100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se filtró a través de un lecho corto gel de sílice. Se evaporó la solución amarilla resultante hasta la sequedad al vacío, dando 2-etoxi-3-(3-nitrofenil)acrilato de etilo en forma de un sólido amarillo (5,6 g, 72 %).

Etapas 4

- 15 Se añadió una solución de hidróxido de potasio (1,3 g, 22,2 mol) en agua (20 ml) a una solución agitada de 2-etoxi-3-(3-nitrofenil)acrilato de etilo (5,6 g, 21,1 mmol) en metanol (100 ml) y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante una noche. Después, se evaporó el metanol al vacío y se diluyó el residuo con agua (150 ml). Se lavó la solución con diclorometano (2 x 80 ml), se filtró a través de un lecho corto de celita y después se acidificó mediante la adición de HCl 3 M a pH 3. Se refrigeró la mezcla durante 18 h y después se recogió el sólido precipitado por filtración, se lavó con agua (3 x 30 ml) y se secó al vacío a 40 °C. Se recrystalizó el sólido resultante en acetato de etilo y heptano, dando ácido 2-etoxi-3-(3-nitrofenil)acrilico en forma de un sólido amarillo (3,06 g, 61 %).

RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6) = 1,34 (3H, t, 7Hz), 4,10 (2H, c, 7Hz), 7,04 (1H, s), 7,69 (1H, t, 7,93Hz), 8,07-8,22 (2H, m), 8,80 (1H, m), 13,25 (1H, s ancho).

Etapas 5

- 25 Se hidrogenó una mezcla de ácido 2-etoxi-3-(3-nitrofenil)acrilico (3,06 g, 12,9 mmol), metanol (150 ml) y paladio sobre carbón vegetal activado al 5 % (0,60 g, 2 % molar) en una atmósfera de H_2 de 82,74-206,84 kPa durante 2 h. Después, se filtró la mezcla a través de celita, se lavó la torta de filtro con metanol y se concentraron los filtrados a 40 °C bajo un alto vacío, dando el producto en forma de un sólido espumoso. Se disolvió este en agua (100 ml) y se liofilizó la solución, dando ácido (±)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil)-propanoico (2,7 g, 100 %) en forma de un sólido blanquecino.

30 RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6) = 1,07 (3H, t, 7 Hz), 2,6-2,85 (2H, m), 3,20-3,38 (1H, m), 3,40-3,60 (1H, m), 3,92 (1H, dd, 5 y 7,7 Hz), 6,3-6,45 (3H, m), 7,01 (1H, t, 7,6 Hz).

Ejemplo 9**Modelización molecular**

- 35 Los estudios de modelización molecular se realizaron con el programa informático SYBYL versión 6.9.1 (Tripos Associates Inc., St Louis, MO) que se ejecuta en estaciones de trabajo Silicon Graphics. Se construyó el modelo

tridimensional de la forma dipolar de 5-ASA a partir de una biblioteca de fragmentos estándar, y luego se optimizó su geometría con el campo de fuerza Tripos (3). Como todavía se desconoce la pKa de los compuestos, se usó la calculadora en línea SPARC para determinar las especies que se dan a pH fisiológico (7,4) (<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>). Se construyó un modelo tridimensional de compuestos ionizados a partir de una biblioteca de fragmentos estándar, y se optimizó después su geometría con el campo de fuerza Tripos (3) incluyendo el término electrostático calculado a partir de las cargas atómicas de Gasteiger y Hückel. Se usó el procedimiento de Powell disponible en el procedimiento Maximin2 para minimizar la energía hasta que el valor del gradiente fue inferior a 0,001 kcal/mol.Å.

Se obtuvo la estructura del dominio de unión al ligando de PPAR γ humano a partir de su estructura cristalina por rayos X compleja con el tesaglitazar (AZ 242) disponible en el banco de datos de proteínas RCSB (1.171) (4,5). Se realizó el acoplamiento flexible de los compuestos en el sitio activo del receptor con el programa informático GOLD (6). Se seleccionaron los modelos de acoplamiento más estables de acuerdo a la configuración con mejor puntuación predicha por las funciones de puntuación GoldScore (6) y X-Score (7). Se minimizaron energéticamente los complejos usando el procedimiento Powell disponible en el procedimiento Maximin2 con el campo de fuerza Tripos y una constante dieléctrica de 4,0 hasta que el valor del gradiente alcanzó 0,01 kcal/mol.Å. Se usó la función de atemperado que define una región caliente (10 Å) y una región interesante (15 Å) en torno al ligando.

Resultados

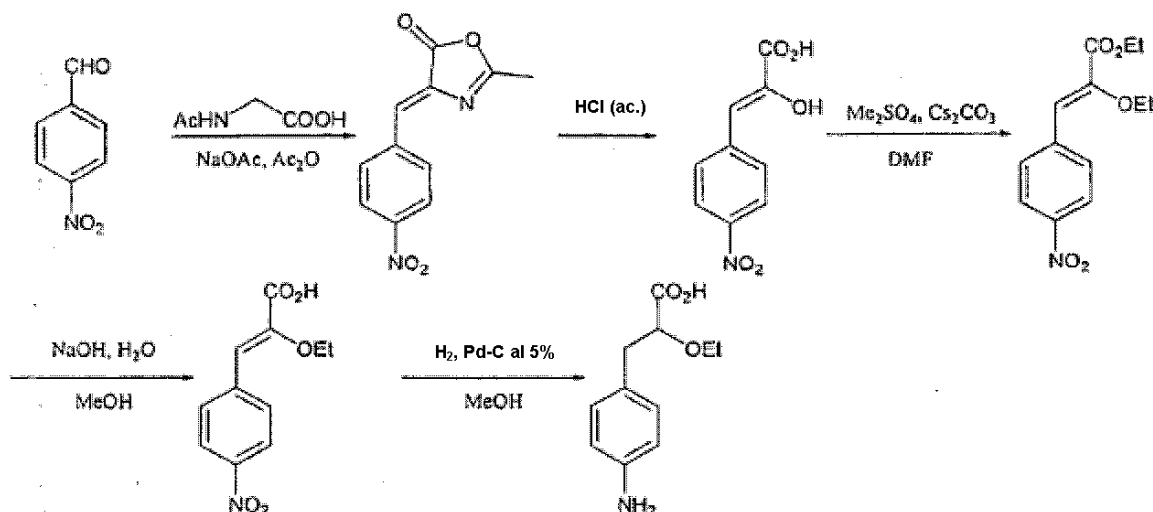
Los estudios de acoplamiento de los receptores mediante modelización molecular predijeron que, en general, el enantiómero *S* es más activo que el enantiómero *R*, a pesar de que el enantiómero *R* también muestra actividad. Este fenómeno de que un enantiómero sea más biológicamente activo es bien conocido.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para resolver los compuestos en enantiómeros. El procedimiento de resolución para el compuesto 32 se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

Aunque no se desee quedar vinculados a la teoría, se cree que los enantiómeros *S* de los compuestos proporcionarán una mayor actividad. Los resultados de los estudios de acoplamiento se muestran en las Figuras 5-10.

Ejemplo 7

Procedimiento de preparación de ácido (\pm)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil)-propiónico (Compuesto 39). Resolución enantiomérica (Figure 12)



30 Etapas 1 y 2

Como para el compuesto 34, etapas 1 y 2.

Etapa 3

Se suspendió ácido 2-hidroxi-3-(4-nitrofenil)acrilico (20 g, 95,6 mmol) en DMF (200 ml). Se añadieron Cs₂CO₃ (74,9 g, 229,9 mmol) y sulfato de dietilo (26,3 ml, 201 mmol), y se observó la disolución. Después de agitar durante 18 horas a 18 °C, se añadieron agua (350 ml) y acetato de etilo (250 ml), y se separaron las capas. Se extrajo la capa acuosa después con acetato de etilo (5 x 200 ml) y luego se lavaron los orgánicos combinados con agua (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml), y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se concentraron los compuestos

orgánicos hasta la sequedad, obteniéndose acetato de 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)-acrilato en forma de un sólido de color naranja que contenía 3,6 % en masa de DMF (27,6 g húmedo, rendimiento de >100 %). RMN de ^1H (δ , 250 MHz, DMSO- d_6): 1,32 (t, 6-H, 2 x CH_2CH_3), 4,13 (c, 2-H, CH_2CH_3), 4,30 (c, 2-H, CH_2CH_3), 6,99 (s, 1-H, CH=), 8,06 (d, 2-H, CH aromático), 8,26 (d, 2-H, CH aromático).

5 *Etapa 4*

Se disolvió 2-etoxi-3-(4-nitrofenil)acrilato de etilo que contenía 3,6 % en peso de DMF (26,07g corregidos, 98,3 mmol) en IMS (500 ml) y se añadió una solución de NaOH (1,44 g, 36,1 mmol) en agua (260 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 18 horas, y luego se acidificó con HCl 1 M (120 ml) y se recogió el sólido resultante por filtración, se lavó con agua (2 x 100 ml) y secó por succión sobre el filtro durante 30 minutos, seguido de.

Resultados

La activación de PPAR γ produce una cascada de reacciones que conduce a una unión a los elementos específicos de la secuencia de ADN denominados elementos de respuesta de los proliferadores de peroxisomas (PPRE) (7-9).

Se investigó la actividad transcripcional de PPAR γ mediante transfecciones transitorias de células epiteliales con la luciferasa Renilla y plámidos de PPRE. Para evaluar si las nuevas moléculas eran más eficaces que 5-ASA en la estimulación de la activación de los PPAR γ , se probaron estas moléculas a una concentración de 1 mM. Se comparó el efecto de las nuevas moléculas a una concentración de 1 mM con 5-ASA y rosiglitazona, usados como controles positivos a concentraciones óptimas de 30 mM y 10^{-5} M, respectivamente. Las células se estimularon con diferentes moléculas durante 24 horas.

El análisis de la actividad de PPAR γ en células HT-29 transfectadas mostró que las nuevas moléculas 34, 39, 35 y 40 a 1 mM aumentaron la actividad del gen indicador en $4,8 \pm 0,71$; $2,73 \pm 0,31$; $2,64 \pm 0,46$; $3,4 \pm 0,97$ veces, respectivamente, mostrando con ello una actividad similar o superior a 5-ASA a 30 mM ($2,8 \pm 0,7$) y rosiglitazona a 10^{-5} M ($3,17 \pm 0,29$).

La Figura 2 representa todos los resultados obtenidos para cada molécula evaluada en 2 o 3 experimentos realizados por triplicado. La reproducibilidad entre los diferentes experimentos es buena y similar a los datos descritos en la bibliografía.

Este estudio permitió a los inventores identificar 4 nuevas moléculas que eran de 30 a 50 veces más eficaces que 5-ASA para activar los PPAR γ .

Ejemplo 11

30 **Crecimiento de células cancerosas de colon**

Se analizaron las siguientes sustancias (es decir, 20, 34, 35, 39 y 40) para determinar su capacidad para modular el crecimiento de células cancerosas de colon. Con este fin, se usaron tres líneas celulares de carcinoma de colon humano (es decir, HT-29, HT-115 y DLD-1). Estos tipos de células se seleccionaron basándose en la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). De hecho, las células HT-115 expresan COX-2 biológicamente activa, las células HT-29 expresan una isoforma de COX-2 no funcional y DLD-1 son células deficientes en COX-2. Se cree que estas moléculas también son activas en las células que no expresan la COX-2, y por lo tanto las moléculas de la presente invención se pueden usar en las células que no expresan COX-2 con el fin de tratar tumores y otras aplicaciones según lo descrito en la presente memoria.

Se cultivaron células HT-29 y DLD-1 en medios McCoy y RPM11640, respectivamente, suplementados con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina/estreptomina (P/E) al 1 % y 50 mg/ml de gentamicina. Se cultivaron HT-115 en medio DMEM suplementado con FBS al 15 % y P/E al 1 %. Se mantuvieron las células en una incubadora humidificada a 37 °C, en presencia de CO_2 al 5 %.

Para los ensayos de crecimiento celular, se sembraron suspensiones de células simples a 2×10^3 células/pocillo (4×10^3 células/pocillo para HT115) en placas de cultivo de 96 pocillos en medio que contenía FBS al 0,5 %, y se permitió su adherencia. A continuación, se eliminaron las células no adherentes, y se añadió medio recién preparado que contenía FBS al 0,5 % en cada pocillo. Se cultivaron las células en presencia o ausencia de las sustancias especificadas. Se disolvió cada sustancia en forma de una solución madre 25 mM en medio de cultivo que contenía FBS al 0,5 %, y se ajustó el pH de cada solución madre hasta 7,4, cuando fue necesario, con NaOH. Las sustancias se usaron a una concentración final que variaba de 0,5 a 10 mM.

Se determinó la proliferación celular mediante la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN usando un kit de proliferación celular disponible en el mercado (Roche Diagnostics, Monza, Italia). Se añadió BrdU a los cultivos celulares durante las últimas 6 horas de incubación, y se evaluó el nivel de células positivas en BrdU tras 48 h de cultivo mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La densidad óptica (DO) se determinó a 450 nm usando un lector de ELISA. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se

presentan como la media \pm la desviación estándar (DE).

Resultados

5 Los compuestos difirieron en su capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas de colon. Los resultados se resumen en la Tabla 1, en la que se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de células DLD-1 por los compuestos especificados. La sustancia 20 presenta un notable efecto antiproliferativo de una manera dependiente de la dosis en cada una de las tres líneas celulares analizadas (Figuras 3 y 4). Cuando se usaron los compuestos a una concentración final de 10 mM, se observó una inhibición del crecimiento celular de más del 90 %. La capacidad del compuesto 20 para inhibir significativamente el crecimiento celular se observó al usarlo a una concentración final de 5 o 10 mM.

10 Los compuestos 34 y 39 redujeron ligeramente el crecimiento celular cuando se usaron a dosis altas (10 mM) (Figura 4), pero las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas. Del mismo modo, no se observó ninguna inhibición del crecimiento celular en los cultivos a los que se añadieron las sustancias 35 y 40 (véase la Tabla 1).

Conclusiones

15 Este primer conjunto de ejemplos de la invención (Ejemplo 10) muestra la capacidad de cuatro moléculas optimizadas 34, 39, 35 y 40 a una concentración de 1 mM para aumentar la actividad de PPAR γ en las células HT-29 transfectadas, mostrando una actividad similar o superior a 5-ASA a 30 mM y rosiglitazona a 10⁻⁵M.

20 Los ejemplos del segundo conjunto de la invención (Ejemplo 11) muestran que los compuestos afectan a la inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de colon, HT-29, HT-115 y DLD1 en diversos grados. Los compuestos difirieron en su capacidad para inhibir el crecimiento celular del cáncer de colon. La sustancia 20 muestra un notable efecto antiproliferativo en las líneas celulares analizadas.

Estas moléculas de la presente invención también son activas en las células que no expresan COX-2, y por lo tanto las moléculas de la presente invención se pueden usar en las células que no expresan COX-2 con el fin de tratar los tumores y otras aplicaciones según lo descrito en la presente memoria.

25 Conclusiones generales

Todos los compuestos sintetizados de mayor puntuación, indicados a partir de estudios de modelización, muestran una actividad similar/superior a la de la mesalazina.

Referencias

- 30 1. Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson y P. Desreumaux. 2003, "Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis". *Gastroenterology* 124:1265-1276.
- 35 2. Rousseaux C., Lefebvre B., Dubuquoy L., Lefebvre P., Romano O., Auwerx J., Metzger D., Wahli W., Desvergne B., Naccari G. C., Chavatte P., Farce A., Bulois P., Cortot A., Colombel J. F., Desreumaux P., "Intestinal anti-inflammatory effect of 5-amino salicylic acid is dependent on PPAR γ ". *J Exp Med* 2005; 201: 1205-15.
- 40 3. Clark, M. C. R. D. I. V. O., N. 1989, "Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Field". *J. Comput Chem.* 10:982-1012.
4. Gampe, R. T., Jr., V. G. Montana, M. H. Lambert, A. B. Miller, R. K. Bledsoe, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, T. M. Willson, y H. E. Xu. 2000, "Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors". *Mol Cell* 5:545-555.
- 45 5. Jones, G., P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach y R. Taylor. 1997, "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking". *J Mol Biol* 267:727-748.
6. Wang, R., L. Lai, y S. Wang. 2002, "Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction". *J Comput Aided Mol Des* 16:19-26.
- 50 7. Westin, S., R. Kurokawa, R. T. Nolte, G. B. Wisely, E. M. McInerney, D. W. Rose, M. V. Milburn, M. G. Rosenfeld y C. K. Glass. 1998, "Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators". *Nature* 395:199-202.
8. Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon *et al.*, 1995, "The nuclear receptor superfamily: the second decade". *Cell* 83:835-839.
9. Misra, P., E. D. Owuor, W. Li, S. Yu, C. Qi, K. Meyer, Y. J. Zhu, M. S. Rao, A. N. Kong y J. K. Reddy. 2002, "Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase". *J Biol Chem* 277:48745-48754, Epub 42002 Sep 48727.

10. Compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en las que el uso del compuesto es en una mezcla en la que un enantiómero está en exceso con respecto al otro, en cualquier proporción.

5 11. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, como principios activos, en combinación con uno o más excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

TABLA 1: % de inhibición de células DLD-1 por dosis graduadas (0,5-10 mM) de los compuestos especificados

mM	% de inhibición del crecimiento				
	0,5	1	2,5	5	10
2-20	4,3	12,8	16,2	25,6	47
2-34	0	3,6	1,8	3,6	15,1
2-35	0	3,2	1,6	6,4	4,8
2-39	1,6	3,3	8,2	11,5	12,8
2-40	2	0	0	0	2,7

Figura 1: Estructura de los compuestos 20, 23, 32, 33, 34, 35, 39, 40

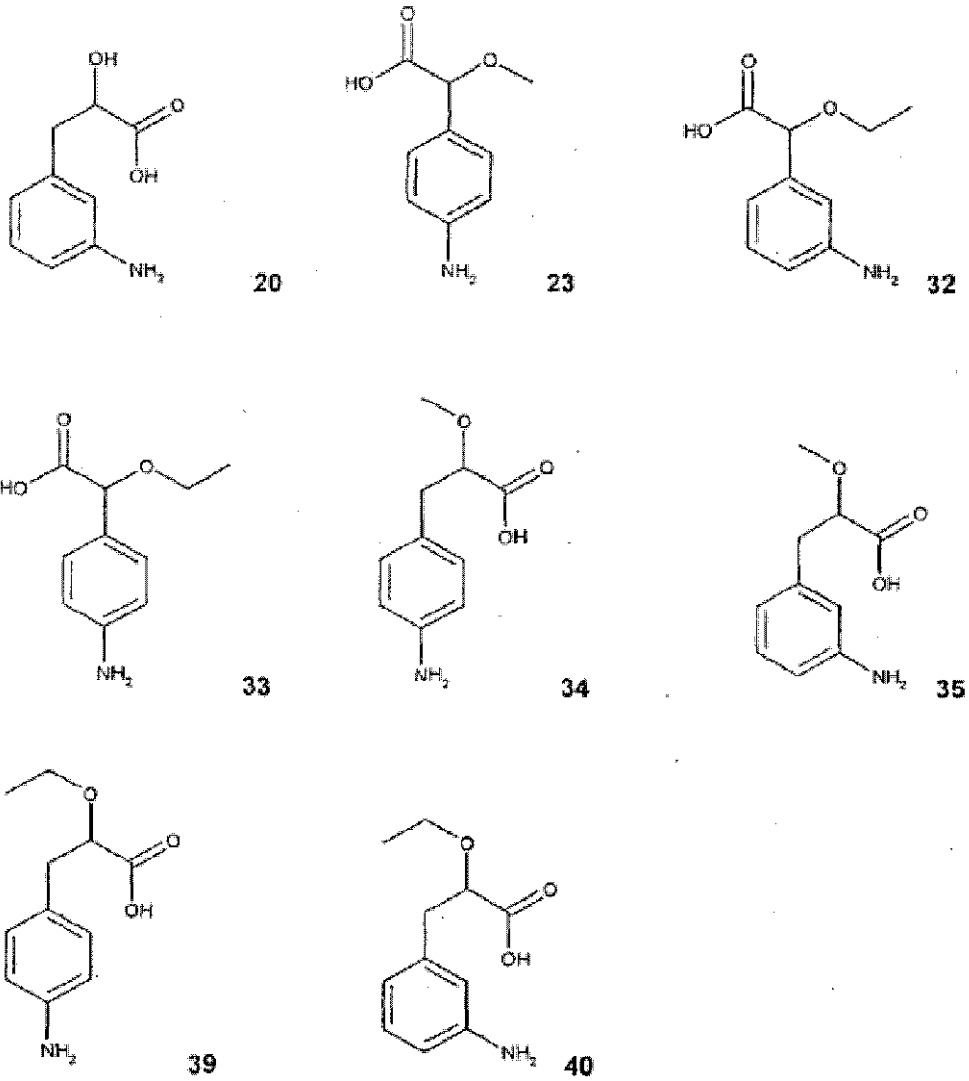


Figura 2: Análisis de la actividad de PPAR γ

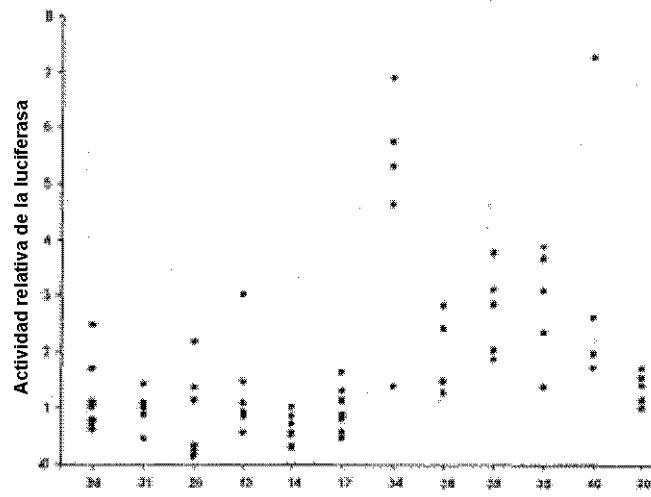
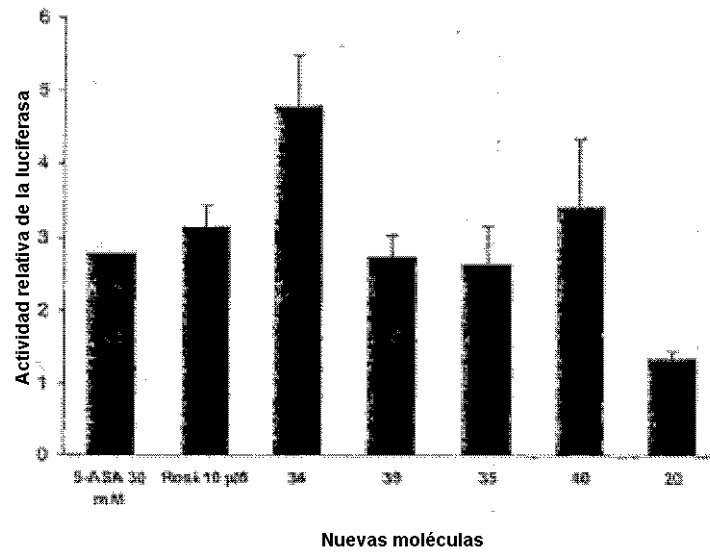
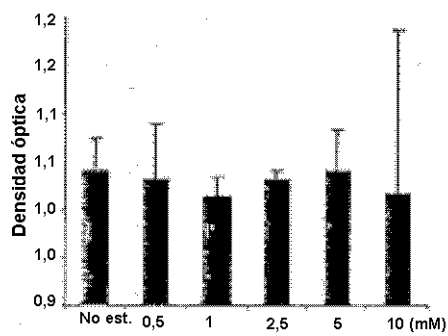


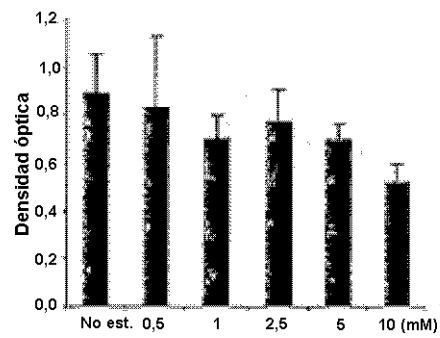
Figura 3: Proliferación de las líneas celulares de carcinoma de colon humano HT29, HT115 y DLD1 en el tratamiento con 0,5-10 mM del nuevo compuesto 20 durante 48 horas

Compuesto 20

HT115



HT29



DLD1

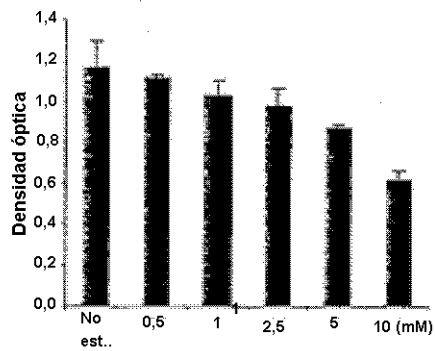


Figura 4: Proliferación de las líneas celulares de carcinoma de colon humano HT29, HT115 y DLD1 en el tratamiento con 0,5-10 mM de los nuevos compuestos 34, 35, 39 y 40 durante 48 horas

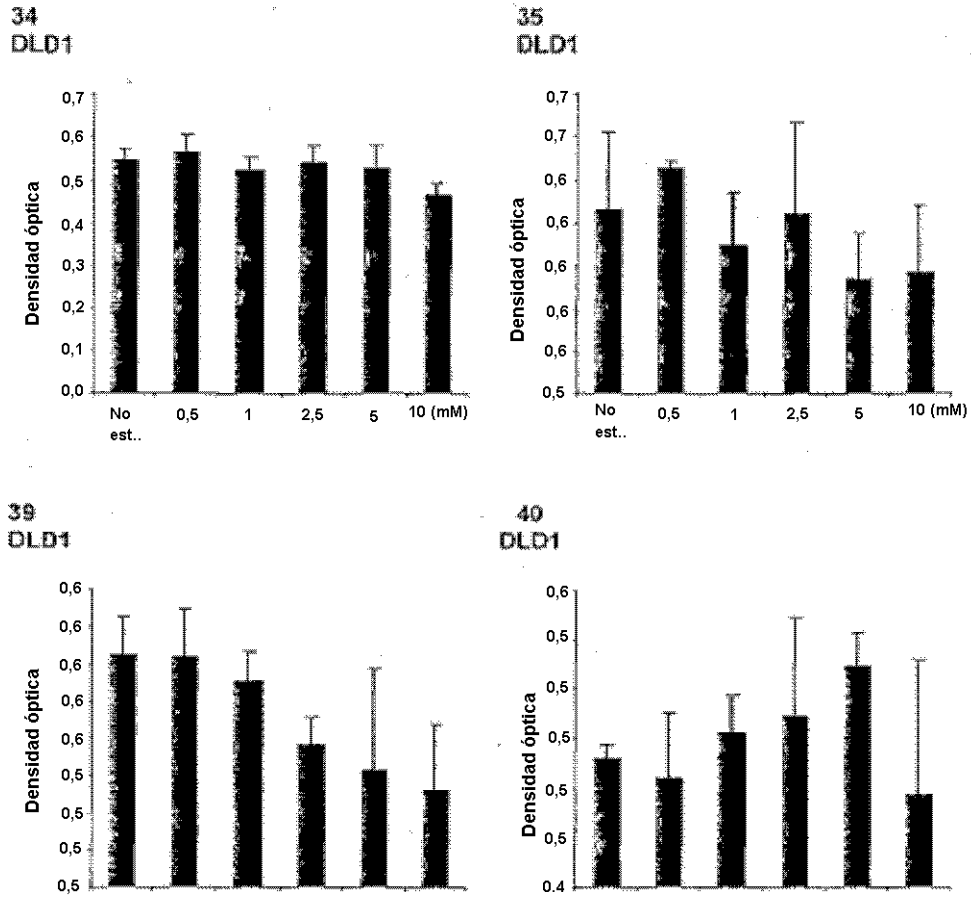


Figura 5: Acoplamiento del Compuesto 34 (R) con el receptor PPAP γ
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

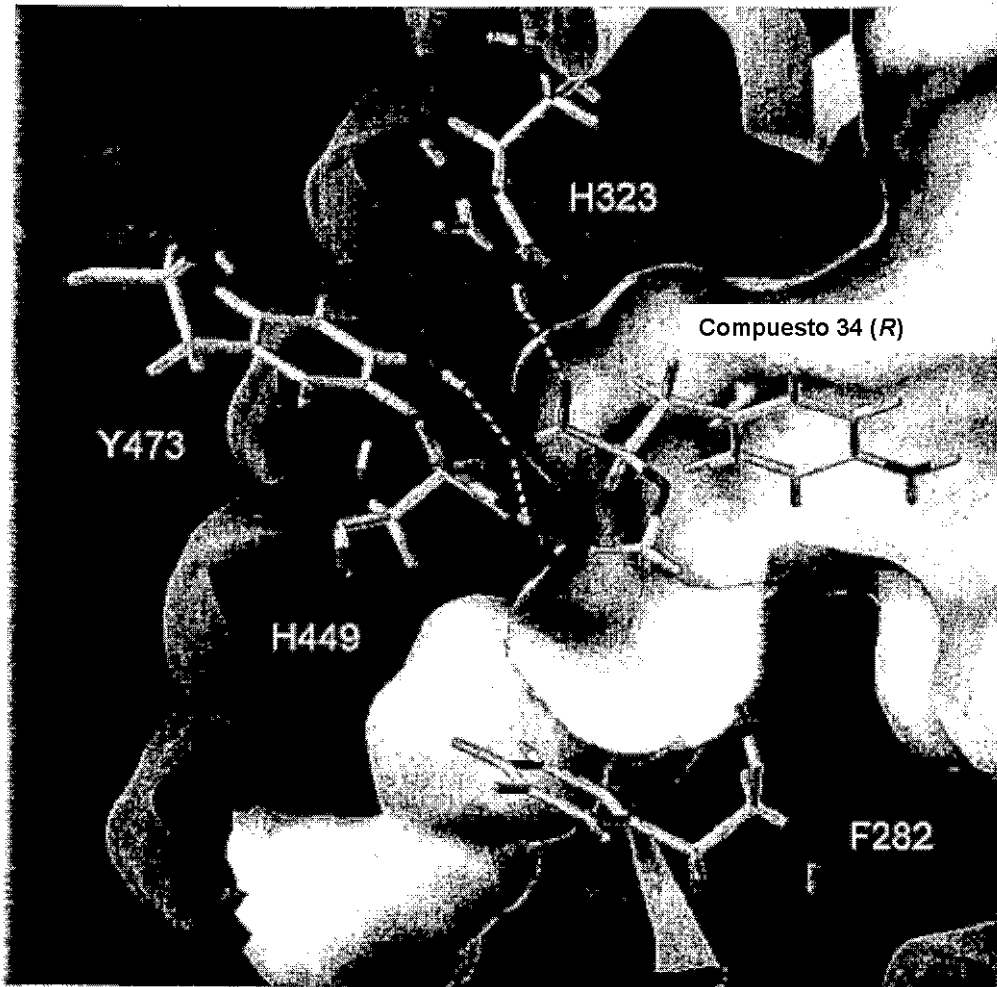


Figura 6: Acoplamiento del Compuesto 34 (S) con el receptor PPAP γ
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

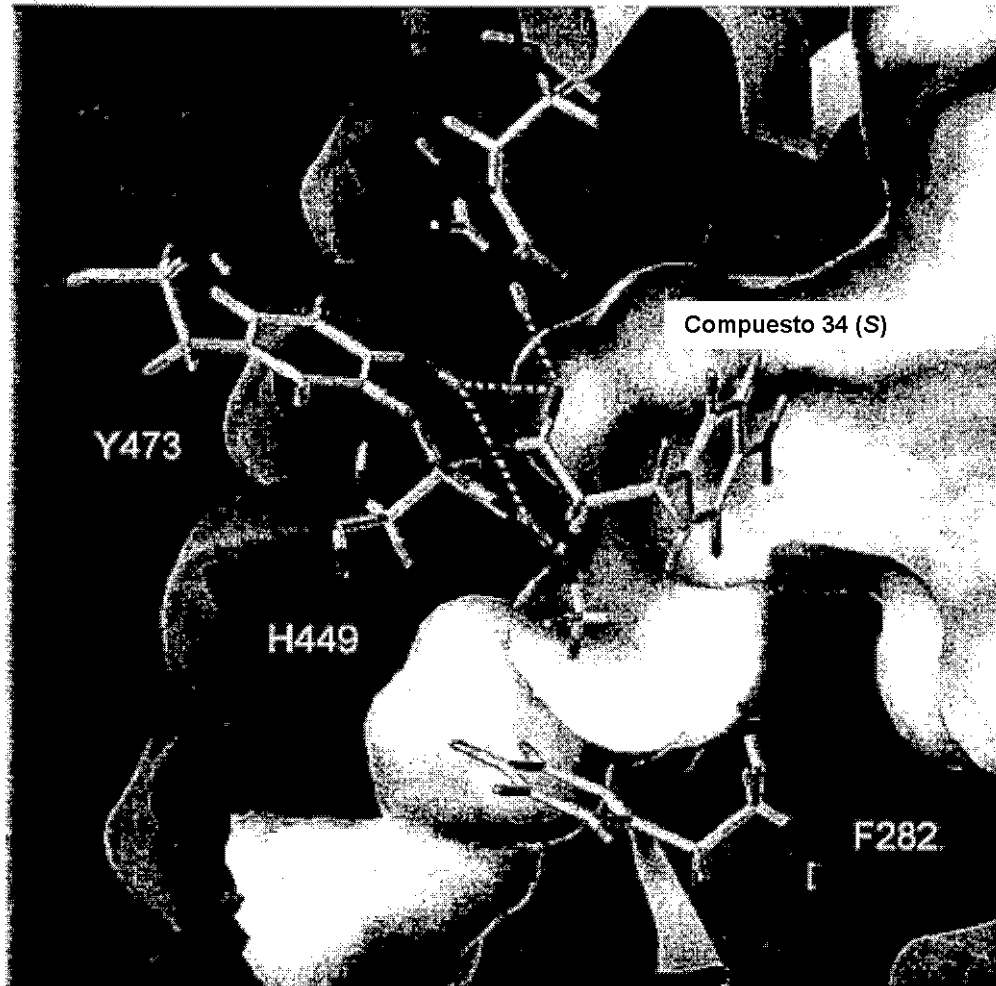


Figura 7: Acoplamiento del Compuesto 35 (R) con el receptor PPAPy
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

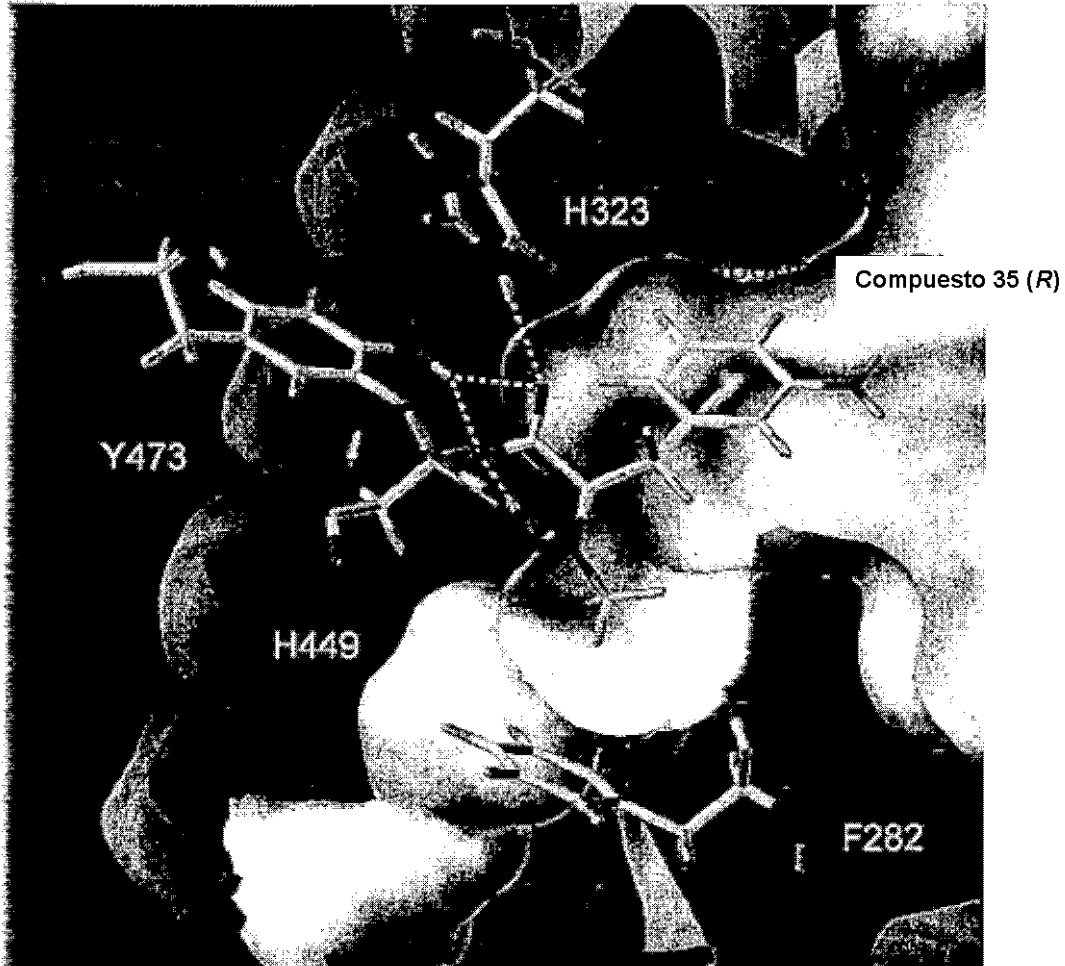


Figura 8: Acoplamiento del Compuesto 35 (S) con el receptor PPAP γ
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

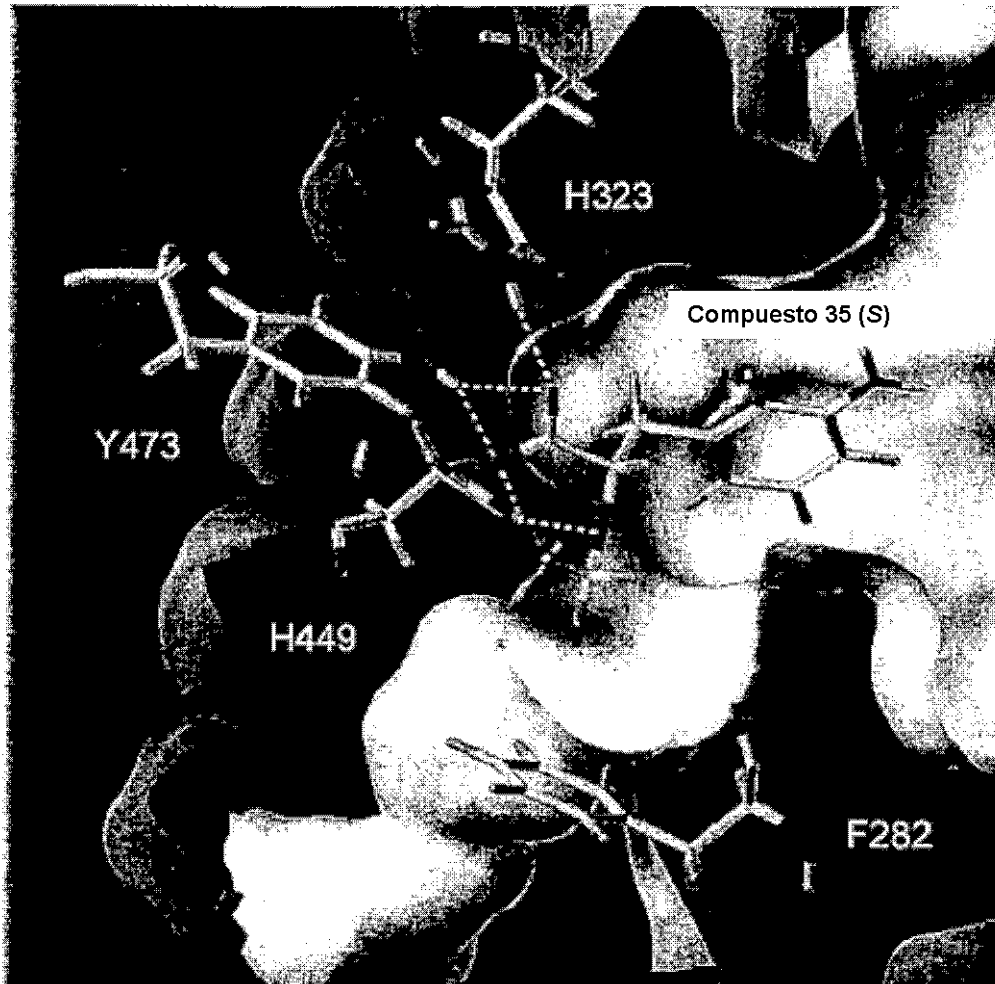


Figura 9: Acoplamiento del Compuesto 39 (R) con el receptor PPAP γ
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

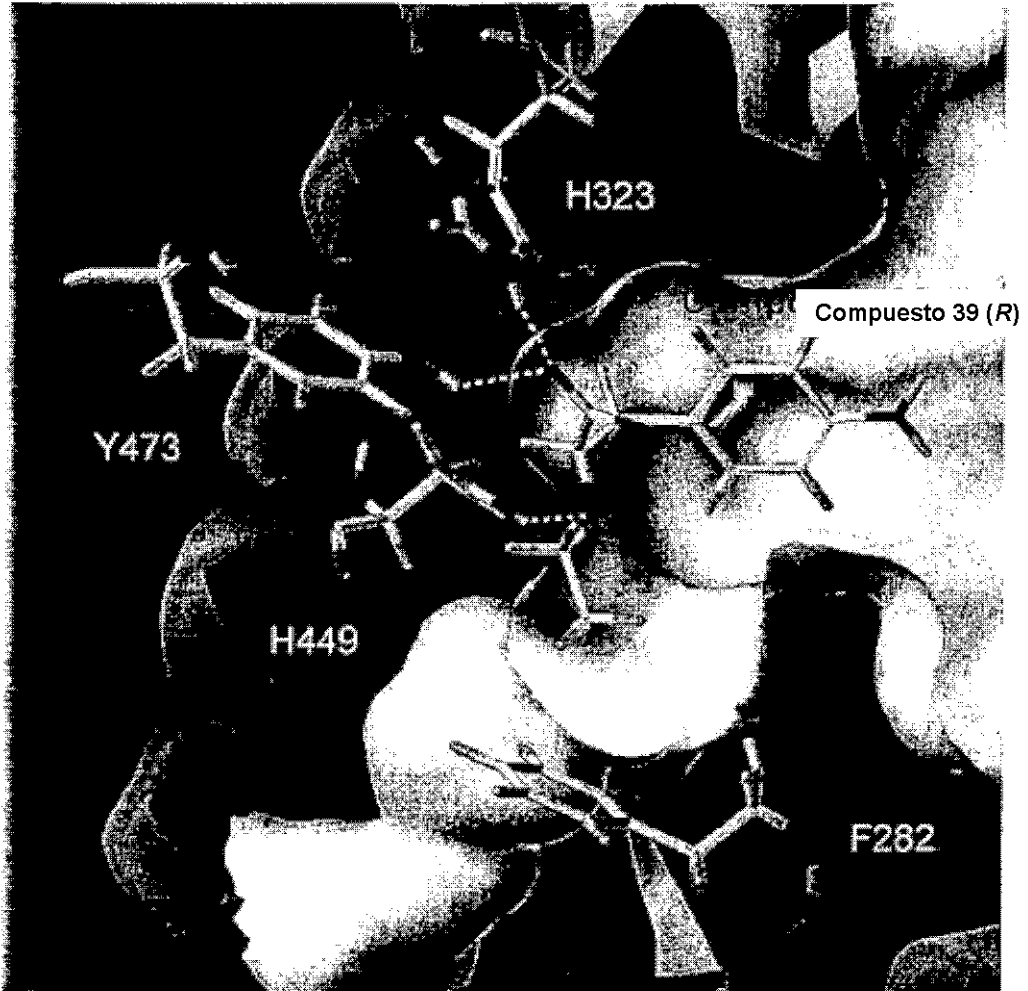


Figura 10: Acoplamiento del Compuesto 39 (S) con el receptor PPAP γ
(se muestran el marcaje de residuos de aminoácido y el puente de hidrógeno)

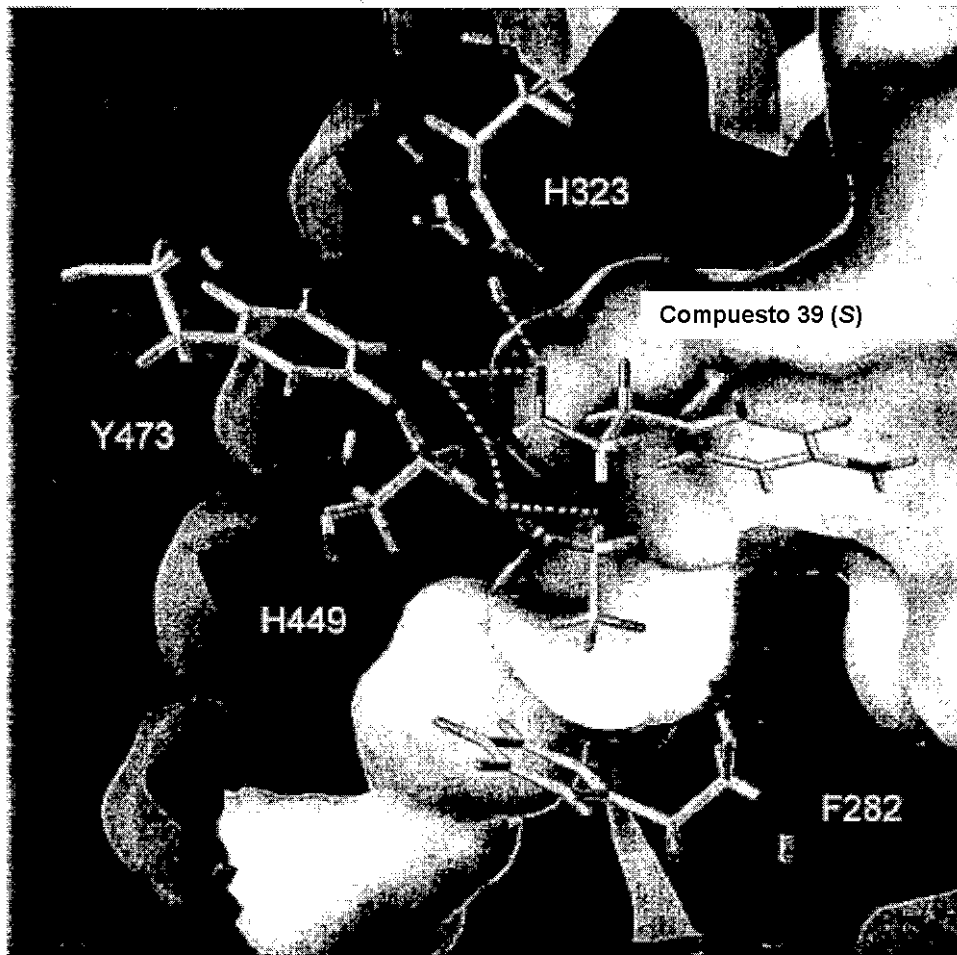


Figura 11. Acoplamiento de ácido 5-aminosalicílico (mesalamina) con el receptor PPAPy
(se muestra el marcaje de los residuos de aminoácido)

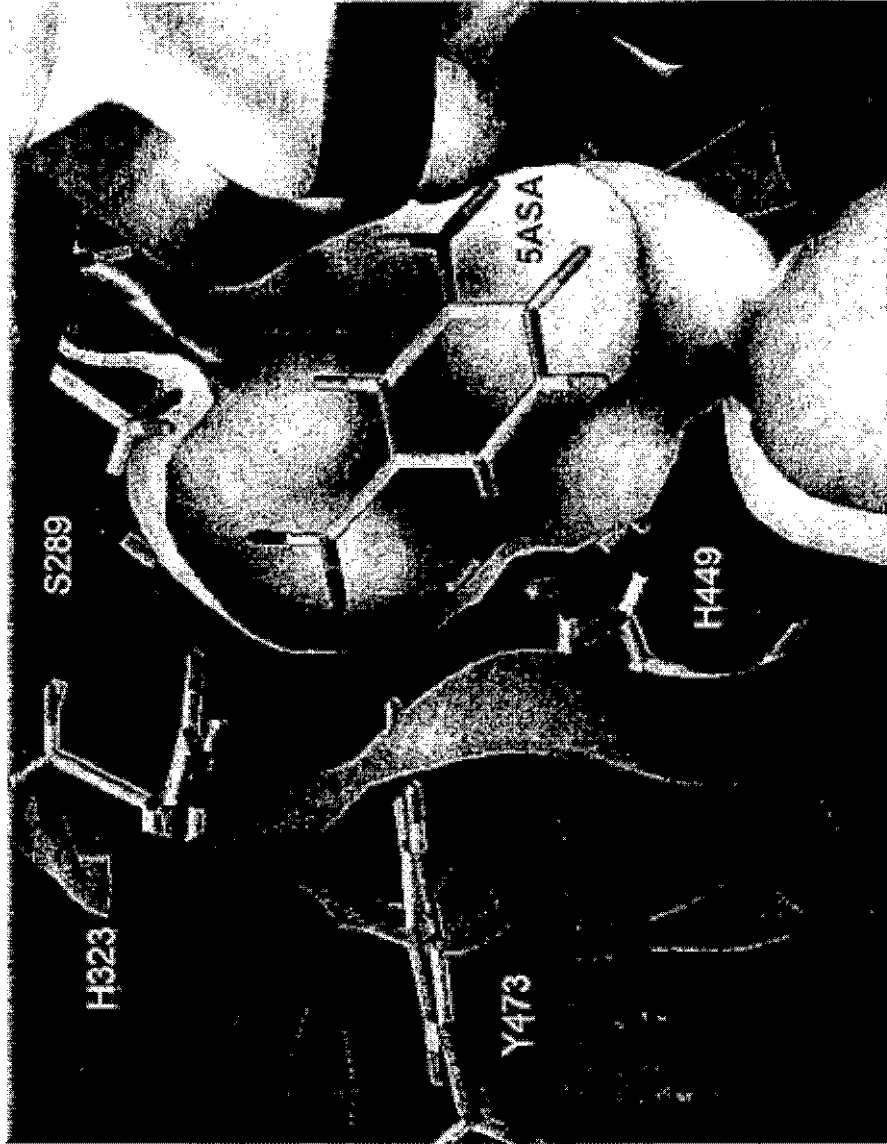


Figura 12: Esquema de síntesis y posterior resolución enantiomérica para el Compuesto 32

