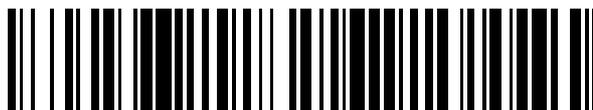


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 268**

51 Int. Cl.:

<b>C07C 59/84</b>	(2006.01)	<b>C07C 323/62</b>	(2006.01)
<b>C07C 59/88</b>	(2006.01)	<b>C07D 335/06</b>	(2006.01)
<b>C07C 59/90</b>	(2006.01)	<b>C07C 59/76</b>	(2006.01)
<b>C07C 251/48</b>	(2006.01)	<b>C07C 69/734</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/192</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/04</b>	(2006.01)		
<b>C07C 59/68</b>	(2006.01)		
<b>C07C 323/22</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2007 E 07730296 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2046715**

54 Título: **Derivados sustituidos de 1,3-difenilpropano, preparaciones y usos**

30 Prioridad:

**21.06.2006 FR 0605540**

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

**09.06.2014**

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 2 466 268 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, preparaciones y usos

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

De manera sorprendente, los inventores han puesto de manifiesto que los compuestos según la invención poseen intrínsecamente propiedades agonistas de PPAR (siglas en inglés de Receptor Activado del Proliferador de Peroxisomas).

10 Por lo tanto, las moléculas descritas en la invención son particularmente interesantes para tratar las complicaciones asociadas con el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemias, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión, enfermedades inflamatorias (asma, etc.), patologías neurodegenerativas (Alzheimer, etc.), cánceres, etc., así como para permitir la reducción del riesgo global. Preferiblemente, los compuestos según la invención se utilizan en el tratamiento de las dislipidemias.

15 La diabetes, la obesidad y las dislipidemias (niveles plasmáticos elevados de colesterol LDL y de triglicéridos, colesterol HDL bajo, etc.) forman parte de los factores de riesgo cardiovascular claramente identificados que predisponen al individuo al desarrollo de una patología cardiovascular (Mensah M., 2004). Estos factores de riesgo se suman a los factores de riesgo asociados con el estilo de vida tales como el tabaquismo, la inactividad física y los regímenes alimentarios desequilibrados. Entre estos diferentes factores se establece un efecto sinérgico: la presencia simultánea de varios de ellos conduce a un marcado agravamiento del riesgo cardiovascular y, por consiguiente, se puede hablar de un riesgo global ("*global risk*") para las enfermedades cardiovasculares. La prevalencia de las dislipidemias afectó a 43,6% de la población en 2004 en los principales países desarrollados. La prevalencia de la diabetes, actualmente en pleno crecimiento, adquiere cada vez mayor importancia en la epidemiología de las enfermedades cardiovasculares: la prevalencia de la diabetes se ha calculado en 7,6% de la población para 2010 (Fox-Tucker J., 2005).

25 Según la Sociedad Internacional de Aterosclerosis (*International Atherosclerosis Society*, 2003), las enfermedades cardiovasculares representan la primera causa de mortalidad en los países industrializados y son cada vez más frecuentes en los países en vías de desarrollo. Estas enfermedades son, en especial, las enfermedades coronarias, la isquemia cerebral y las enfermedades arteriales periféricas.

30 Estos datos justifican, por lo tanto, que se haya convertido en una urgencia mundial la adopción de medidas enérgicas para reducir de manera importante la morbilidad y mortalidad cardiovasculares, y la necesidad de encontrar tratamientos eficaces, complementarios a la modificación del estilo de vida, capaces de actuar sobre los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y sobre sus consecuencias.

35 Los compuestos según la invención, debido a sus propiedades agonistas de PPAR, presentan un interés particular para el tratamiento de patologías asociadas con los trastornos del metabolismo de lípidos y/o glúcidos tales como la diabetes, la obesidad, las dislipidemias o la inflamación, así como para reducir el riesgo cardiovascular global.

40 Es conocido que los PPAR ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) intervienen en este tipo de patologías (Kota BP. et al., 2005); por consiguiente, en el comercio hay disponibles ligandos de estos receptores para tratar estas patologías (Lefebvre P. et al., 2006) y, en la actualidad, se encuentran en avanzada fase de desarrollo numerosos moduladores de PPAR, agonistas o antagonistas, selectivos o no. En el tratamiento del síndrome metabólico (o síndrome X) se podría utilizar un modulador de PPAR dotado de efectos beneficiosos sobre la resistencia a la insulina, la obesidad, las dislipidemias, la hipertensión y/o la inflamación (Liu Y. y Miller A., 2005).

45 La familia de los PPAR comprende tres isoformas denominadas  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (también llamada  $\beta$ ), cada una de las cuales está codificada por un gen diferente. Estos receptores forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares y de 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 de Retinoides) y se fijan sobre elementos específicos de respuesta (PPRE o Elemento de Respuesta de Proliferación de Peroxisomas) a nivel del promotor de sus genes diana, permitiendo de esta forma el control de la transcripción.

50 PPAR $\alpha$  controla el metabolismo lipídico (hepático y muscular) y la homeostasia de la glucosa, actúa sobre el metabolismo intracelular de los lípidos y azúcares por medio de un control directo de la transcripción de los genes que codifican las proteínas que intervienen en la homeostasia lipídica, ejerce efectos antiinflamatorios y antiproliferativos y previene los efectos pro-aterogénicos de la acumulación de colesterol en los macrófagos, estimulando la eliminación del colesterol (Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C. y Staels, B., 2006). De este modo, se utilizan clínicamente los fibratos (fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrozil), por intermedio de PPAR $\alpha$ ,

para el tratamiento de ciertas dislipidemias, porque reducen los triglicéridos y aumentan los niveles de colesterol HDL (siglas en inglés de *High Density Lipoprotein*).

5 PPAR $\gamma$  es un regulador clave de la adipogénesis. Adicionalmente, participa en el metabolismo lipídico de los adipocitos maduros, en la homeostasia de la glucosa, en especial 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, MA., 2005). Por lo tanto, el PPAR $\gamma$  desempeña una función en la patogénesis de la obesidad, de la resistencia a la insulina y de la diabetes. Los ligandos del receptor PPAR $\gamma$  que se usan en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 son las tiazolidinodionas (rosiglitazona, troglitazona, etc.).

10 Existen ligandos de PPAR $\delta$  (L-165041, GW501516, actualmente en desarrollo clínico), pero hasta la fecha no se utiliza ningún ligando de PPAR $\delta$  como medicamento. Sin embargo, este receptor es un objetivo atractivo para el desarrollo de medicamentos que se pueden utilizar en el tratamiento de las dislipidemias, la aterosclerosis, la obesidad y la resistencia a la insulina: de hecho, PPAR $\delta$  interviene en el control de metabolismo de lípidos y glúcidos, en el equilibrio energético, en la neurodegeneración, en la obesidad, en la formación de células espumosas y en la inflamación (Gross, B. et al., 2005).

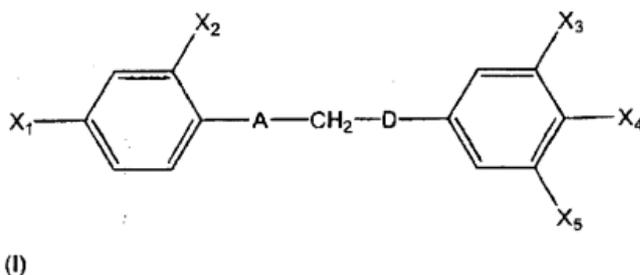
15 Más allá del papel directo que juegan los ligandos de PPAR sobre la regulación del metabolismo de lípidos y glúcidos, estas moléculas tienen un espectro de acción pleiotrópico debido a la gran diversidad de genes diana de los PPAR. Estas múltiples propiedades hacen de los PPAR objetivos terapéuticos de interés para el tratamiento de enfermedades como la aterosclerosis, la isquemia cerebral, la hipertensión, las enfermedades relacionadas con una neovascularización (retinopatías diabéticas, etc.), las enfermedades inflamatorias y autoinmunes (enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerosos múltiple, asma, etc.), las enfermedades neoplásicas (carcinogénesis, etc.), las enfermedades neurodegenerativas, las complicaciones asociadas con el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la diabetes, las dislipidemias, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, etc., así como para permitir la disminución del riesgo global.

25 Los compuestos de la invención, debido a sus propiedades agonistas de PPAR, representan por tanto una herramienta terapéutica ventajosa para mejorar las patologías relacionadas con los trastornos del metabolismo de lípidos y/o glúcidos, en particular de las dislipidemias, así como para reducir el riesgo cardiovascular global.

30 De manera más general, al actuar simultáneamente sobre múltiples procesos de regulación, los compuestos de la invención representan un medio terapéutico apropiado para tratar las complicaciones asociadas con el síndrome metabólico (cuyas características son obesidad, en particular la obesidad abdominal, una concentración anormal de lípidos en sangre (niveles elevados de triglicéridos y/o niveles bajos de colesterol HDL (dislipidemia)), una glucemia elevada y/o una resistencia a la insulina e hipertensión), la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades inflamatorias (asma, etc.), las patologías neurodegenerativas (Alzheimer, etc.), los cánceres, etc., así como para permitir la reducción del riesgo global.

35 Morishita et al. (Morishita et al.: "Synthesis and hypolipidaemic activity of 2-substituted isobutyric acid derivatives", *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society, Washington, EE.UU., vol. 31, n° 6, junio 1988 (1988-06), páginas 1205-1209) dan a conocer compuestos hipolipemiantes, diferentes de la presente invención. El documento DE 4121849 y Labaudinère, R. et al. (*Journal of Medicinal Chemistry American Chemical Society*, Washington, EE.UU., vol. 35, n° 17, 1992, páginas 3156-3169) describen inhibidores de la hidrolasa del leucotrieno A4 en el tratamiento de la inflamación crónica tal como el tratamiento del reumatismo, psoriasis y otras enfermedades de la piel, pero los compuestos descritos son diferentes de los de la presente invención. El documento DE 4627365 da a conocer compuestos fenólicos y derivados fenólicos como agentes que disminuyen la concentración plasmática de fibrinógeno.

La presente invención tiene por objeto los compuestos derivados de 1,3-difenilpropano sustituido de la fórmula general (I) siguiente:



en la cual:

X1 significa un grupo R1 o G1-R1;

X2 significa un átomo de hidrógeno;

X3 significa un grupo R3;

5 X4 significa un grupo G4-R4, en donde G4 significa un átomo de oxígeno;

X5 significa un grupo R5;

R1 significa un grupo alquilo no halogenado;

R3 y R5, idénticos o diferentes, significan un grupo alquilo no sustituido;

G1 significa un átomo de oxígeno o de azufre;

10 R4 significa un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR9;

A significa:

i) un grupo -CR6R7, en el que R6 significa un átomo de hidrógeno y R7 significa un grupo alquilo, un grupo hidroxilo, o un grupo -OR8, en donde R8 significa un grupo alquilo, sustituido o no con un grupo arilo o cicloalquilo, o

15 ii) un grupo carbonilo (CO),

D significa un átomo de carbono unido a dos átomos de hidrógeno (CH<sub>2</sub>),

R9 significa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo no sustituido;

sus estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros) puros o mezclados, mezclas racémicas, isómeros geométricos, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, formas sólidas, así como sus mezclas.

20 En el marco de la presente invención, el término "alquilo" significa un radical hidrocarburo saturado, lineal, ramificado o cíclico, halogenado o no, que tiene, de forma más particular, de 1 a 24, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono. Como ejemplos, se pueden citar 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 el que se ha definido anteriormente y que forma al menos un ciclo. Como ejemplos de grupos cicloalquilo que tienen de 3 a 8 átomos de carbono se pueden mencionar ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "alquiloxi" hace referencia a una cadena alquilo unida a la molécula a través de un átomo de oxígeno (enlace éter). La cadena alquilo se corresponde con la definición anterior. Como ejemplos, se pueden mencionar los radicales metoxi, trifluorometoxi, etoxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butoxi, isobutoxi, terc-butoxi, sec-butoxi o hexiloxi.

30 El término "arilo" hace referencia a grupos aromáticos que comprenden preferiblemente 5 a 14 átomos de carbono, convenientemente 6 a 14 átomos de carbono, interrumpidos eventualmente por uno o múltiples heteroátomos seleccionados entre N, O, S o P (denominados más específicamente "heteroarilo"). Por lo general, son mono- o bicíclicos y comprenden convenientemente 6 a 14 átomos de carbono tales como fenilo,  $\alpha$ -naftilo,  $\beta$ -naftilo, antracénilo o fluorenilo.

35 La expresión "heterociclo oxigenado o sulfurado" designa un grupo cicloalquilo tal como se ha definido anteriormente, interrumpido por uno o múltiples heteroátomos seleccionados entre O y S. A modo de ejemplo, se pueden citar tiopirano o pirano.

Por átomo de halógeno se entiende un átomo de bromo, cloro, flúor o yodo.

40 Un radical alquilo no halogenado es un radical alquilo como se ha definido anteriormente que no presenta ningún átomo de halógeno.

Un aspecto particular de la invención se refiere a compuestos de la fórmula general (I) en la que A significa un grupo carbonilo (CO).

Otro aspecto particular de la invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) en la que A significa un grupo -CR6R7, en donde R6 significa un átomo de hidrógeno y R7 significa un grupo hidroxilo.

5 Un aspecto adicional preferido de la invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) en la que A significa un grupo -CR6R7, en donde R6 significa un átomo de hidrógeno y R7 significa un grupo -OR8, en donde R8 es como se ha definido anteriormente. En particular, R8 significa un grupo alquilo que comprende, preferiblemente, 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono. De manera todavía más preferible, R8 significa un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo o cicloalquilo, en donde el citado grupo arilo o cicloalquilo comprende, en particular, 6 átomos de carbono.

10 Según la invención, X3 y X5, idénticos o diferentes, significan respectivamente un grupo R3 y R5, en donde R3 y R5, idénticos o diferentes, significan un grupo alquilo no sustituido que contiene preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono. De forma todavía más preferible, X3 y X5, idénticos o diferentes, significan un grupo metilo.

Otro aspecto particular de la invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) en la que X4 significa un grupo G4-R4,

15 en donde G4 significa un átomo de oxígeno y R4 significa un grupo alquilo que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con COOR9, en particular con COOH. De forma todavía más preferible, X4 significa un grupo -OC(CH3)2COOH o -OCH2COOH.

Un aspecto particular de la invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) en la que -COOR9, en donde R9 significa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que contiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono.

20 Preferiblemente, X4 significa un grupo -OC(CH3)2COOR9, en donde R9 es como se ha definido anteriormente y significa, preferiblemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono.

Según la invención, los compuestos tienen la fórmula general (I) en la que X1 significa un grupo R1 o G1R1, en donde

G1 es como se ha definido anteriormente, y

R1 significa un grupo alquilo no halogenado.

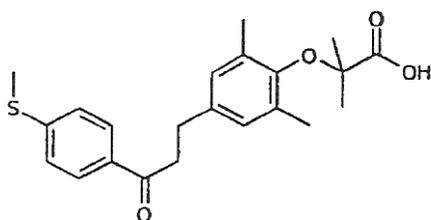
25 A modo de ejemplo, X1 puede significar un grupo -OCH2CH2CH3, -SCH2CH2CH3, o un grupo alquilo que tiene 7 átomos de carbono.

Preferiblemente, R1 significa un grupo alquilo no halogenado que contiene 1, 2 ó 3 átomos de carbono.

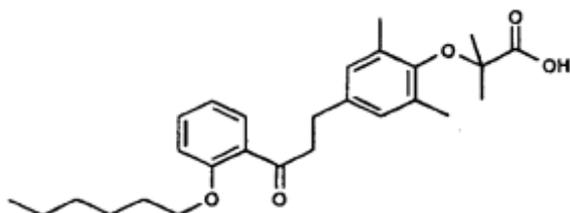
De forma todavía más preferible, X1 significa un grupo -CH3, -SCH3, -OCH3.

30 A continuación, se indican los compuestos que forman parte de la presente invención, así como los compuestos comparativos:

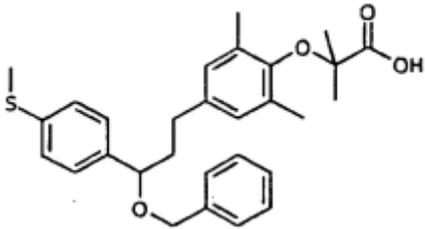
Compuesto 1: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



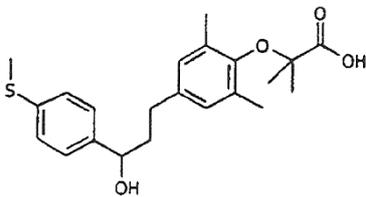
Compuesto 2 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(hexiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Compuesto 3: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-benciloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico

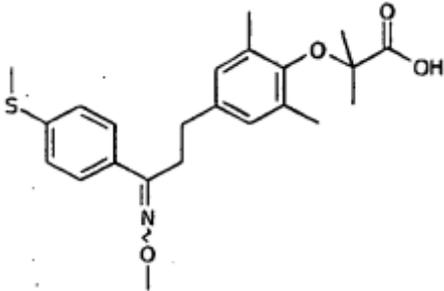


Compuesto 4: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxiopropil]fenoxi]-2-metil-propanoico

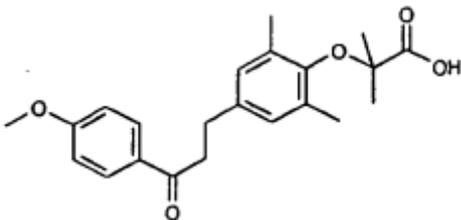


5

Compuesto 5 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-metoxiimino-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

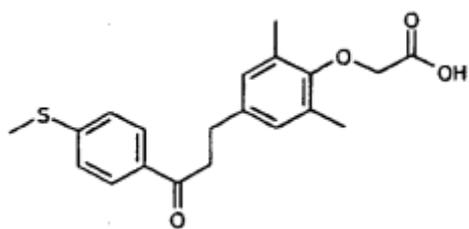


Compuesto 6: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

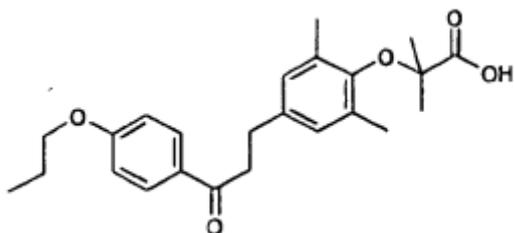


10

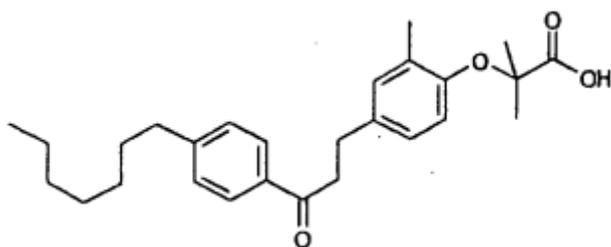
Compuesto 7: Ácido 2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi-etanoico



Compuesto 8: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

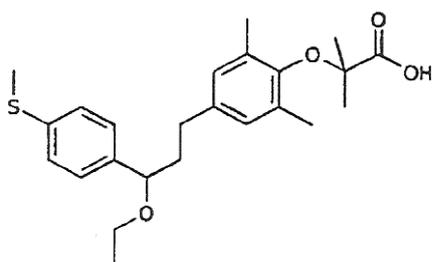


Compuesto 9: Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(heptil)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

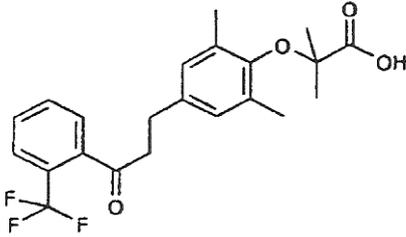


5

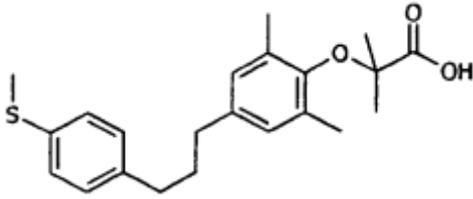
Compuesto 10: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-etiloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



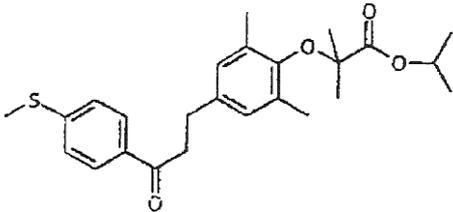
Compuesto 11 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(trifluorometil)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Compuesto 12 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metilitio)fenil]propil]fenoxy]-2-metil-propanoico

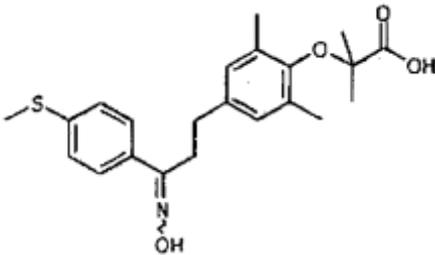


Compuesto 13: 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxy]-2-metil-propanoato de isopropilo

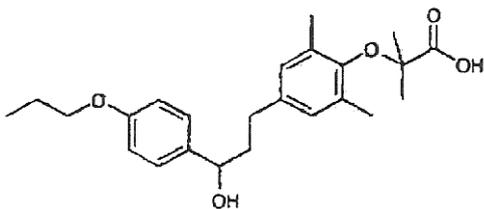


5

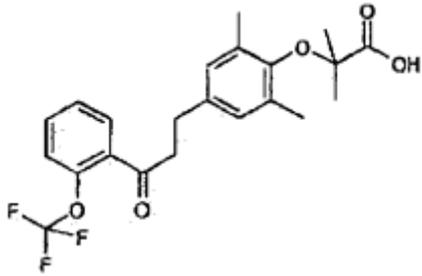
Compuesto 14 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxiimino-propil]fenoxy]-2-metil-propanoico



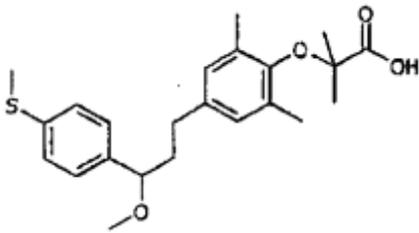
Compuesto 15: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxy]-2-metil-propanoico



Compuesto 16 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

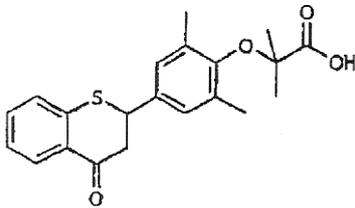


Compuesto 17: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-metoxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico

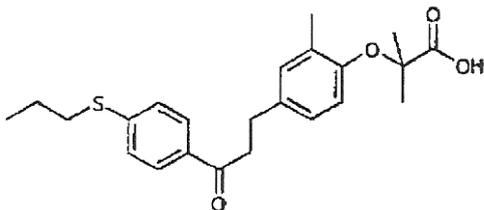


5

Compuesto 18 (comparativo): Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[2,3-dihidro-4H-1-benzotiopiran-4-ona-2-il]fenoxi]-2-metil-propanoico

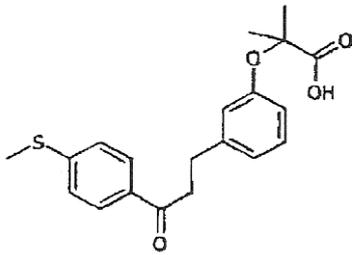


Compuesto 19 (comparativo): Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(propiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

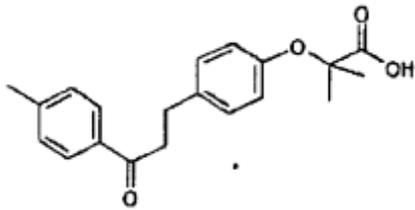


10

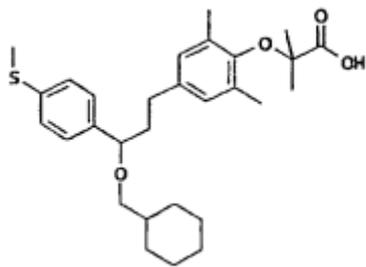
Compuesto 20 (comparativo): Ácido 2-[3-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Compuesto 21 (comparativo): Ácido 2-[4-[3-[4-metilfenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

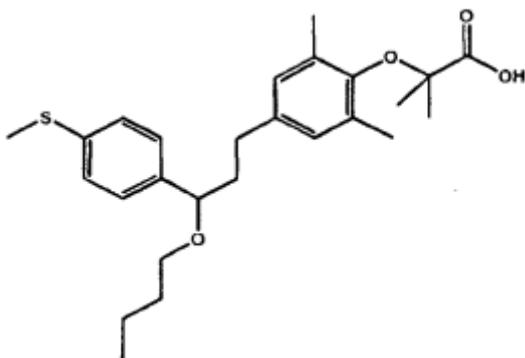


Compuesto 22: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-ciclohexilmetoxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico

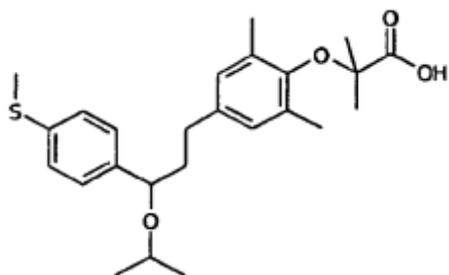


5

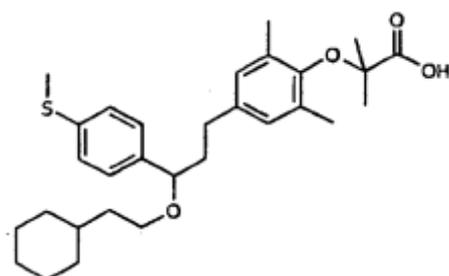
Compuesto 23: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-butiloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Compuesto 24: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-isopropiloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Compuesto 25: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-ciclohexetil-oxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



- 5 Los compuestos preferidos de la presente invención son los que citan en la reivindicación 7. La invención se refiere, de manera todavía más preferible, a los compuestos siguientes:

Compuesto 1: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;

Compuesto 8: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;

Compuesto 13: 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoato de isopropilo.

- 10 Los compuestos de la presente invención comprenden sus estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros), puros o mezclados, sus mezclas racémicas, sus isómeros geométricos, sus tautómeros, sus sales, sus hidratos, sus solvatos, sus formas sólidas, así como sus mezclas.

- 15 Los compuestos según la invención pueden contener uno o múltiples centros asimétricos. La presente invención incluye los estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros), puros o mezclados, así como las mezclas racémicas y los isómeros geométricos. Cuando se desee una mezcla enantioméricamente pura (o enriquecida), ésta se podrá obtener por purificación del producto final o de los intermedios quirales, o por síntesis asimétrica según los métodos conocidos por el experto 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.

- 20 La presente invención se refiere, igualmente, a las sales "farmacéuticamente aceptables" de los compuestos según la invención. De manera general, esta expresión designa las sales poco o no tóxicas obtenidas a partir de bases o de ácidos, orgánicas o inorgánicas. Estas sales se pueden obtener en la etapa de purificación final del compuesto según la invención, o mediante la incorporación de la sal en el compuesto ya purificado.

- 25 Ciertos compuestos según la invención y sus sales pueden ser estables bajo múltiples formas sólidas. La presente invención incluye todas las formas sólidas de los compuestos según la invención, lo cual incluye las formas amorfas, polimórfas, mono- y policristalinas.

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

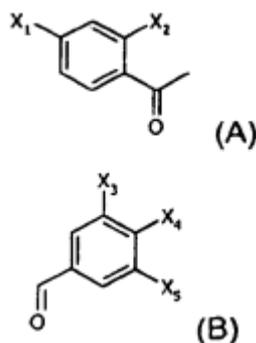
- 30 En la invención están incluidos también los compuestos según la invención marcados con uno o múltiples isótopos: estos compuestos son estructuralmente idénticos, pero diferentes debido a que al menos un átomo de la estructura

- está sustituido con un isótopo (radiactivo o no). Ejemplos de isótopos que se pueden incluir en la estructura de los compuestos según la invención se pueden seleccionar de hidrógeno, carbono, oxígeno, azufre tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ , respectivamente. Se prefieren, de manera particular, los isótopos radiactivos  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  porque su preparación es sencilla y son fácilmente detectables en el marco de los estudios de biodisponibilidad *in vivo* de las sustancias. Se prefieren en particular los isótopos pesados (tales como  $^2\text{H}$ ) porque se les utiliza como estándares internos en los estudios analíticos.

La presente invención tiene asimismo como objeto un procedimiento de síntesis de los compuestos de la fórmula general (I), tal como se han definido anteriormente.

El procedimiento de la presente invención comprende:

- 10 – una etapa en la que se pone en contacto (i) en medio básico o en medio ácido 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 las definiciones indicadas anteriormente,

- a continuación, (ii) una etapa de reducción de los compuestos obtenidos de este modo,
- 15 – y, eventualmente, (iii) una etapa de inserción de grupos funcionales.

Las condiciones bajo las que se llevan a cabo la etapa (i) en medio ácido o básico y la etapa (ii) están al alcance del experto en la técnica y pueden variar en gran medida. Los protocolos de síntesis pueden ser, en particular, los que se presentan en la sección de “ejemplos” de la presente invención.

- 20 La puesta en contacto de estos dos compuestos se lleva a cabo, convenientemente, de forma estequiométrica. Preferiblemente, se efectúa a temperatura ambiente (entre aproximadamente 18°C y 25°C) y a presión atmosférica.

En medio básico, la reacción se efectúa preferiblemente en presencia de una base fuerte tal como un hidróxido de metal alcalino como hidróxido sódico o un alcoholato de metal alcalino como el etilato sódico.

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

- 25 Los compuestos obtenidos de esta forma se pueden aislar por métodos clásicos, conocidos por el experto en la técnica. Seguidamente, se les puede usar de manera especial como medicamentos o productos cosméticos.

La presente invención tiene también como objeto los compuestos descritos anteriormente, a modo de medicamentos.

- 30 La presente invención tiene también como objeto una composición farmacéutica que comprende, en un soporte farmacéuticamente aceptable, al menos un compuesto como los descritos más arriba, eventualmente en asociación con uno o múltiples principios activos terapéuticos y/o cosméticos adicionales.

- 35 De manera conveniente, esta es una composición farmacéutica para el tratamiento de las complicaciones asociadas con el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, de la diabetes, las dislipidemias, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, la hipertensión, las enfermedades inflamatorias (asma, etc.), las patologías neurodegenerativas (Alzheimer, etc.), o los cánceres, etc. La composición farmacéutica según la invención se utiliza preferiblemente para tratar las dislipidemias.

Preferiblemente, es una composición farmacéutica para tratar los factores de riesgo cardiovascular relacionados con trastornos del metabolismo de lípidos y/o glúcidos (hiperlipidemia, diabetes de tipo 2, obesidad, etc.), permitiendo reducir el riesgo global.

5 Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición nutricional que comprende al menos un compuesto como los descritos anteriormente.

10 Otro objeto de la invención es el uso de al menos un compuesto como los descritos anteriormente para preparar composiciones farmacéuticas dirigidas al tratamiento de diversas patologías relacionadas, en especial, con trastornos del metabolismo, entre los que se pueden citar las dislipidemias. De manera más general, la invención tiene como objeto el uso de al menos un compuesto como los descritos más arriba para preparar composiciones farmacéuticas dirigidas al tratamiento de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares relacionadas con trastornos del metabolismo de lípidos y/o glúcidos, y destinadas a reducir de esta forma el riesgo global.

A modo de ejemplo (y sin limitaciones), los compuestos según la invención se podrán administrar de forma conveniente en combinación con otros agentes terapéuticos y/o cosméticos, comercializados o en fase de desarrollo, tales como:

- 15 – Antidiabéticos: insulino-secretoras (sulfonilureas (glibenclamida, glimepirida, gliclazida, etc.) y glinidas (repaglinida, nateglinida, etc.)), inhibidores de la alfa-glucosidasa, agonistas de PPAR $\gamma$  (tiazolidinodionas tales como rosiglitazona, pioglitazona), agonistas mixtos de PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  (tesaglitazar, muraglitazar), pan-PPAR (compuestos que activan simultáneamente las 3 isoformas de PPAR), biguanidas (metformina),
- 20 – inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (MK-431, vildagliptina), agonistas del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) (exenatida), etc.
- Insulina
- Moléculas hipolipemiantes y/o hipocolesteromiantes: fibratos (fenofibrato, gemfibrozil), inhibidores de la HMG CoA reductasa o hidroximetilglutaril Coenzima A reductasa (estatinas tales como atorvastatina, simvastatina, fluvastatina), inhibidores de la absorción del colesterol (ezetimiba, fitoesteroles), inhibidores de la CETP o Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol (torcetrapib), inhibidores de la ACAT o Acil Coenzima A colesterol acil-transferasa (Avasimiba, Eflucimiba), inhibidores de MTP (Proteína Microsomal Transportadora de Triglicéridos), agentes secuestrantes de los ácidos biliares (colestiramina), vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos omega 3, derivados de tipo ácido nicotínico (niacina), etc.
- 25 – Agentes antihipertensores y agentes hipotensores: inhibidores de la ECA (Enzima Conversora de la Angiotensina) (captopril, enalapril, ramipril o quinapril), antagonistas del receptor de la angiotensina II (losartan, valsartan, telmisartan, eposartan, irbesartan, etc.), beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol), diuréticos tiazídicos y no tiazídicos (furosemida, indapamida, hidroclorotiazida, anti-aldosterona), vasodilatadores, bloqueadores de los canales del calcio (nifedipina, felodipina o amlodipina, diltiazem o verapamilo), etc.
- 30 – Agentes antiplaquetarios: aspirina, ticlopidina, dipiridamol, clopidogrel, flurbiprofeno, etc.
- Agentes antiobesidad: sibutramina, inhibidores de lipasas (orlistat), agonistas y antagonistas de PPAR $\gamma$ , antagonistas del receptor de cannabinoides CB1 (rimonabant), etc.
- 35 – Agentes antiinflamatorios: por ejemplo, corticosteroides (prednisona, betametasona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, hidroclorisona, etc.), AINEs o Antiinflamatorios No Esteroides derivados del indol (indometacina, sulindac), AINEs del grupo de los aril-carboxílicos (ácido tiaprofénico, diclofenaco, etodolaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, nabumetona, alminoprofeno), AINEs derivados del oxicam (meloxicam, piroxicam, tenoxicam), AINEs del grupo de los fenamatos, inhibidores selectivos de la COX2 (celecoxib, rofecoxib), etc.
- 40 – Agentes antioxidantes: por ejemplo, probucol, etc.
- Agentes usados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca: diuréticos tiazídicos y no tiazídicos (furosemida, indapamida, hidroclorotiazida, anti-aldosterona), inhibidores de la ECA (captopril, enalapril, ramipril o quinapril), digitálicos (digoxina, digitoxina), beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol), inhibidores de las fosfodiesterasas (enoximona, milrinona), etc.
- 45

- Agentes usados para el tratamiento de la insuficiencia coronaria: beta-bloqueadores (atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol), bloqueadores de los canales de calcio (nifedipina, felodipina o amlodipina, bepridil, diltiazem o verapamilo), agentes dadores de NO (trinitrina, isosorbida dinitrato, molsidomina), amiodarona, etc.
- 5      – Anticancerosos: agentes citotóxicos (agentes que interaccionan con el ADN, agentes alquilantes, cisplatino y derivados), agentes citostáticos (análogos de GnRH (Hormona Liberadora de la Gonadotropina), análogos de la somastatina, progestágenos, antiestrógenos, inhibidores de la aromataza, etc.), moduladores de la respuesta inmunitaria (interferones, IL2, etc.), etc.
- 10     – Antiasmáticos tales como los broncodilatadores (agonistas de los receptores beta 2), corticosteroides, cromoglicato, antagonistas de receptor de leucotrienos (montelukast), etc.
- Corticosteroides usados en el tratamiento de patologías de la piel tales como la psoriasis y las dermatitis
- Vasodilatadores y/o agentes anti-isquémicos (buflomedil, extracto de Gingko biloba, naftidrofurilo, pentoxifilina, piribedil), etc.

15      La invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de las patologías relacionadas con el metabolismo de lípidos y/o glúcidos, el cual comprende la administración a un sujeto, en especial humano, de una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica tales como se han definido anteriormente. En el sentido de la invención, la expresión “una cantidad eficaz” hace referencia a una cantidad del compuesto suficiente para producir el resultado biológico deseado. En el sentido de la presente invención, el término “sujeto” significa un mamífero y, de manera más particular, un ser humano.

20      El término “tratamiento” designa el tratamiento curativo, sintomático o preventivo. De esta forma, los compuestos de la presente invención se pueden usar en sujetos (tales como mamíferos, especialmente humanos) afectados por una enfermedad declarada. Asimismo, los compuestos de la presente invención se pueden usar para retrasar o ralentizar la progresión o prevenir una progresión más adelante de la enfermedad, mejorando de este modo el estado de los sujetos. Por último, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a sujetos no enfermos, pero que podrían desarrollar normalmente la enfermedad o que tienen un riesgo o importante de desarrollar la enfermedad.

25      Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden, convenientemente, uno o múltiples excipientes o vehículos, aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Por ejemplo, cabe citar soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc., compatibles con una utilización farmacéutica y conocidas por el experto en la técnica.

30      Las composiciones pueden contener uno o múltiples agentes o vehículos seleccionados de dispersantes, solubilizadores, estabilizadores, conservantes, etc. Agentes o vehículos que se pueden usar en las formulaciones (líquidas y/o inyectables y/o sólidas) son normalmente metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, acacia, liposomas, etc. Las composiciones se pueden formular como suspensiones inyectables, geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, grageas, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente mediante formas galénicas o dispositivos que garantizan una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulaciones se utilizan, de manera conveniente, agentes tales como celulosa, carbonatos o almidón.

40      Los compuestos o composiciones según la invención se pueden administrar de maneras diferentes y bajo diferentes formas. De este modo, se les puede administrar, por ejemplo, de forma sistémica, por vía oral, parenteral, por inhalación o por inyección tal como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarterial, etc. Para las inyecciones, los compuestos se acondicionan generalmente en forma de suspensiones líquidas que se pueden inyectar, por ejemplo, mediante jeringas o por perfusión.

45      Se entiende que el experto en la técnica podrá adaptar la cantidad y/o la dosis inyectada en función del paciente, la patología, la forma de administración, etc. Típicamente, los compuestos se administran a dosis que pueden variar entre 1 µg y 2 g por administración, preferiblemente de 0,1 mg a 1 g por administración. Las administraciones pueden ser diarias o, en caso necesario, repetirse varias veces al día. Por otra parte, las composiciones según la invención pueden comprender, además, otros agentes o principios activos.

### Leyendas de las figuras

Abreviaturas utilizadas en las figuras:

- Comp. = compuestos;
- 50      – Ctrl = control;

- mpk = mg/kg/día;
- Colesterol LDL = colesterol-lipoproteína de baja densidad
- Colesterol HDL = colesterol-lipoproteína de alta densidad
- Colesterol VLDL = colesterol-lipoproteína de muy baja densidad

5 Figuras 1-1 a 1-66: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR de los compuestos según la invención, en función de la dosis

La activación de PPAR se evalúa *in vitro* en una línea de fibroblastos renales de mono (COS-7), midiendo la actividad de transcripción de quimeras constituidas por el dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 de levadura y el dominio de unión al ligando de diferentes PPARs.

10 Los compuestos se estudian a dosis comprendidas entre  $10^{-7}$  y  $100 \mu\text{M}$  sobre quimeras Gal4-PPAR $\alpha,\gamma,\delta$ . Para cada condición, se mide el factor de inducción, es decir, la relación entre la luminiscencia inducida por el compuesto y la luminiscencia inducida por el control. Cuanto más elevado sea el factor de inducción, mayor será el carácter activador del PPAR del compuesto.

- Figuras 1-1, 1-2, 1-3: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 1;
- 15 - Figuras 1-4-, 1-5, 1-6: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 2;
- Figuras 1-7, 1-8, 1-9: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 3;
- Figuras 1-10, 1-11, 1-12: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 4;
- 20 - Figuras 1-13, 1-14, 1-15: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 5;
- Figuras 1-16, 1-17, 1-18: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 6;
- Figuras 1-19, 1-20, 1-21: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 7;
- 25 - Figuras 1-22, 1-23, 1-24: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 8;
- Figuras 1-25, 1-26, 1-27: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 9;
- 30 - Figuras 1-28, 1-29, 1-30: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 10;
- Figuras 1-31, 1-32, 1-33: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 11;
- Figuras 1-34, 1-35, 1-36: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 12;
- 35 - Figuras 1-37, 1-38, 1-39: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 14;
- Figuras 1-40, 1-41, 1-42: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 17;
- 40 - Figuras 1-43, 1-44, 1-45: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 18;
- Figuras 1-46, 1-47, 1-48: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 19;

- Figuras 1-49, 1-50, 1-51: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 20;
- Figuras 1-52, 1-53, 1-54: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 21;
- 5 – Figuras 1-55, 1-56, 1-57: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 22;
- Figuras 1-58, 1-59, 1-60: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 23;
- 10 – Figuras 1-61, 1-62, 1-63: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 24;
- Figuras 1-64, 1-65, 1-66: Evaluación *in vitro* de las propiedades de activación de PPAR $\alpha,\gamma,\delta$  del compuesto 25.

Figuras 2-1 a 2-9: Evaluación *in vivo*, en el ratón ApoE2/E2, de las propiedades hipolipemiantes y de las propiedades de estimulación de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención.

- 15 El efecto de los compuestos según la invención se evalúa *in vivo*, en el ratón humanizado para la isoforma E2 de la apolipoproteína E (E2/E2).

En el ratón dislipidémico E2/E2 se miden las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma, después de 8 ó 14 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención. Se comparan estos parámetros con los obtenidos en los animales de control (no tratados con los compuestos según la invención); la diferencia medida demuestra el efecto hipolipemiante de los compuestos según la invención.

- 20
- Figura 2-1: Concentración plasmática de colesterol después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk;
  - Figura 2-2: Concentración plasmática de triglicéridos después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk;
- 25
- Figura 2-3: Concentración plasmática de colesterol después de 14 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk.

Asimismo, se evalúa la eficacia de los compuestos según la invención midiendo en el tejido hepático la expresión de los genes que intervienen en el metabolismo de lípidos y/o glúcidos y la disipación de energía. Los niveles de expresión de cada gen se homologan en relación con el nivel de expresión del gen de referencia 36B4. A

30 continuación, se calcula el factor de inducción, es decir, la proporción entre la señal relativa (inducida por el compuesto según la invención) y la media de los valores relativos del grupo de control. Cuanto más elevado 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.

- 35
- Figura 2-4: Expresión de PDK4 (Piruvato Deshidrogenasa Quinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en el ratón E2/E2, después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk.
  - Figura 2-5: Expresión de ApoCIII (Apolipoproteína C3) en el tejido hepático, en el ratón E2/E2, después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk;
  - Figura 2-6: Expresión de ACO (acil-Coenzima A oxidasa 1, palmitoilo) en el tejido hepático, en el ratón E2/E2, después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk;
- 40
- Figura 2-7: Expresión de PDK4 (Piruvato Deshidrogenasa Quinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en el ratón E2/E2, después de 14 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk;
  - Figura 2-8: Expresión de ApoCIII (Apolipoproteína C3) en el tejido hepático, en el ratón E2/E2, después de 14 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk;
- 45
- Figura 2-9: Expresión de ACO (acil-Coenzima A oxidasa 1, palmitoilo) en el tejido hepático, después de 14 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk.

Figuras 3-1 a 3-9: Evaluación *in vivo*, en el ratón db/db, de las propiedades hipolipemiantes y de estimulación de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención.

El efecto de los compuestos según la invención se evalúa *in vivo* en el ratón db/db, midiendo las concentraciones de colesterol HDL, los triglicéridos y los ácidos grasos libres en plasma después de 28 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención. Estos parámetros se comparan con los obtenidos en los animales de control (no tratados con los compuestos según la invención); la diferencia medida demuestra el efecto hipolipemiante de los compuestos según la invención.

– Figura 3-1: Concentración plasmática de colesterol HDL después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk;

– Figura 3-2: Concentración plasmática de triglicéridos después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk;

– Figura 3-3: Concentración plasmática de ácidos grasos libres después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk.

Asimismo, se evalúa la eficacia de los compuestos según la invención midiendo en los tejidos hepáticos y musculares (esqueléticos) la expresión de los genes que intervienen en el metabolismo de lípidos, glúcidos y la disipación de energía. Los niveles de expresión de cada gen se homologan en relación con el nivel de expresión de los genes de referencia 36B4 en el tejido hepático o 18S en el músculo esquelético gastrocnemio. A continuación, se calcula el factor de inducción, es decir, la proporción entre la señal relativa (inducida por el compuesto según la invención) y la media de los valores relativos del grupo de control. Cuanto más elevado 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 3-4: Expresión de PDK4 (Piruvato Deshidrogenasa Quinasa, isoforma 4) en el tejido hepático, en el ratón db/db, después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk;

– Figura 3-5: Expresión de ACO (acil-Coenzima A oxidasa 1, palmitoilo) en el tejido hepático, en el ratón db/db, después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk;

– Figura 3-6: Expresión de UCP2 (proteína desacoplante 2) en el músculo esquelético, en el ratón db/db, después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk.

Figuras 4-1 a 4-3: Evaluación *in vitro* de las propiedades antiinflamatorias de los compuestos según la invención, midiendo la secreción de MCP1 desde los monocitos tratados con los compuestos según la invención y estimulados con PMA

Los efectos antiinflamatorios de los compuestos según la invención se evaluaron midiendo la secreción de MCP1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1) desde monocitos THP-1 tratados durante 24 horas con los compuestos según la invención y estimulados simultáneamente con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, que provoca una respuesta inflamatoria de las células y su diferenciación en macrófagos). Cuanto menor sea la cantidad de MCP-1 secretada, mayor será la inhibición de la reacción inflamatoria del compuesto según la invención.

– Figura 4-1: Secreción de MCP1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1) en monocitos THP1, después de 24 horas de tratamiento con el compuesto 8 administrado a 1  $\mu$ M.

#### **Análisis estadísticos**

Los estudios estadísticos llevados a cabo consisten en una prueba T de Student ( $^{\circ}/^{\circ\circ}/^{\circ\circ\circ}$ ) y/o un Análisis de Varianza univariado de un factor (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey ( $^*/^{**}/^{***}$ ). Los resultados se comparan con respecto al grupo de control según el valor del parámetro p:

$^{\circ}/^*$ :  $p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ}/^{**}$ :  $p < 0,01$ ;  $^{\circ\circ\circ}/^{***}$ :  $p < 0,001$ .

#### **Ejemplos**

Los reactivos y catalizadores habituales están disponibles en el comercio (Aldrich, Alfa Aesar, Acros, Fluka o Lancaster, según los casos).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN  $^1\text{H}$ ) se han registrado en un espectrómetro Bruker AC300P. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (partes por millón) y las multiplicidades se abrevian de la forma habitual.

Ejemplo 1: Descripción de los protocolos generales de síntesis

- 5 Los compuestos descritos se obtienen por reducción, según uno de los protocolos mencionados más adelante, de los compuestos reivindicados y/o descritos en la Patente US2005176808.

Procedimiento general A: reducción de difenilproponas con trietilsilano

- 10 La difenilpropen-2-ona se disuelve en diclorometano. Se agregan trietilsilano y, a continuación, gota a gota, ácido trifluoroacético (7,5 equivalentes). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se sigue la progresión de la reacción por cromatografía de capa fina. Una vez que se ha consumido el producto de partida, el medio se lava con agua. Se extrae la fase acuosa con diclorometano, se combinan las fases orgánicas, se secan sobre sulfato de magnesio y, seguidamente, se retira el disolvente por evaporación a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC preparativa, Lichrospher (Merck) RP18 12  $\mu\text{m}$  100 Å, columna: 25\*250 mm).

- 15 Procedimiento general B: reducción de difenilproponas con tetraclorosilano

- 20 La difenilpropen-2-ona se disuelve en acetonitrilo. Se agrega yoduro sódico y, a continuación, gota a gota, tetraclorosilano. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente, y se sigue la progresión de la reacción por cromatografía de capa fina. Una vez que se ha consumido el producto de partida (30 min a 2 horas), el medio se diluye con cloroformo y, seguidamente, se lava con agua. Se extrae la capa acuosa con cloroformo, se combinan las fases orgánicas y se lavan con una solución saturada de sulfito sódico y, entonces, se secan sobre sulfato de magnesio. El disolvente se retira por evaporación a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC preparativa, Lichrospher (Merck) RP18 12  $\mu\text{m}$  100Å, columna: 25\*250 mm).

Procedimiento general C: síntesis de oximas y éteres de oxima

- 25 La difenilpropan-3-ona se disuelve en piridina. Se agrega el hidrocloreuro de O-alkilhidroxilamina. Después de 16 horas de reflujo, el medio se evapora a presión reducida y se purifica el residuo de evaporación por cromatografía instantánea sobre gel de sílice.

Procedimiento general D: síntesis de alcoholes

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

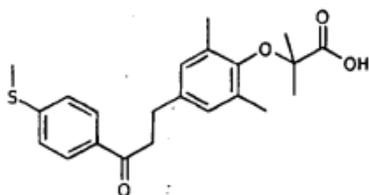
La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre sulfato de magnesio, el cloruro de metileno se retira por evaporación a presión reducida, y se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC preparativa, Lichrospher (Merck) RP18 12  $\mu\text{m}$  100Å, columna: 25\*250 mm).

- 35 Procedimiento general E: síntesis de éteres

- 40 El difenilpropan-3-ol se disuelve en una mezcla de agua/etanol en presencia de una cantidad catalítica de ácido trifluoroacético. El medio de reacción se mantiene bajo agitación intensa a la temperatura apropiada y, a continuación, se concentra a presión reducida y se extrae con cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y, luego, se concentran a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC preparativa, Lichrospher (Merck) RP18 12  $\mu\text{m}$  100Å, columna: 25\*250 mm).

Ejemplo 2: Síntesis de los compuestos descritos

Compuesto 1 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Este compuesto se prepara según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 1,3 equivalentes de trietilsilano:

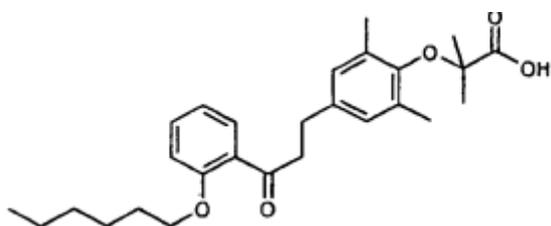
Aspecto: sólido blanco; P.F. = 109-110°C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,42 (s, 6H), 2,19 (s, 6H), 2,53 (s, 3H), 2,89 (t, 2H, J=7,59Hz), 3,25 (t, 2H, J=7,59Hz), 6,89 (s, 2H), 7,31 (d, 2H, J=8,17Hz), 7,88 (d, 2H, J=8,17Hz).

SM(ES-MS) : 385,3 (M-1).

5

Compuesto 2: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(hexiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



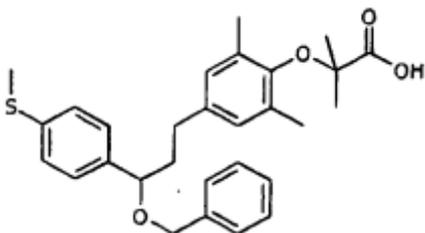
Este compuesto se preparó según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(hexiloxi)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 1 equivalente de trietilsilano;

10 Aspecto: sólido blanco; P.F. = 73-75°C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 0,89 (t, 3H, J=6,72Hz), 1,32 (m, 4H), 1,45 (m, 2H), 1,52 (s, 6H), 1,82 (m, 2H), 2,21 (s, 6H), 2,93 (t, 2H, J=8,19Hz), 3,33 (t, 2H, J=8,19Hz), 4,05 (t, 2H, J=6,42Hz), 6,87 (s, 2H), 6,95 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 7,68 (dd, 1H, J=1,77Hz, J=7,89Hz).

SM(ES-MS) : 439,4 (M-1).

Compuesto 3 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-benciloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



15 El ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico se disuelve en N,N-dimetilformamida y, entonces, esta solución se trata a 0°C con hidruro sódico (2,2 equivalentes) durante 15 min. A continuación, se agrega bromuro de bencilo (2,2 equivalentes) y el medio se mantiene bajo agitación durante 16 horas hasta recuperar la temperatura ambiente. El medio se diluye con ayuda de una solución saturada de cloruro

de amonio y se extrae con acetato etílico. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentran a presión reducida.

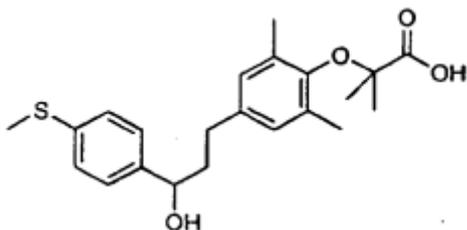
- 5 El residuo de evaporación se disuelve en etanol en presencia de sosa 2N (20 eq.). Después de agitar durante 6 horas, los disolventes se evaporan a presión reducida. El residuo se acidifica con ayuda de una solución diluida de ácido clorhídrico y se extrae con cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentran a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (HPLC preparativa, Lichrospher (Merck) RP18 12  $\mu\text{m}$  100Å, columna: 25\*250 mm).

Aspecto: sólido blancuzco; P.F. = 69-71°C.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) : 1,49 (s, 6H), 1,90 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,19 (s, 6H), 2,52 (m, 1H), 2,52 (s, 3H), 2,68 (m, 1H), 4,24 (d, 1H,  $J=11,8\text{Hz}$ ), 4,28 (t, 1H,  $J=5,25\text{Hz}$ ), 4,47 (d, 1H,  $J=11,8\text{Hz}$ ), 6,77 (s, 2H), 7,31 (m, 9H).**

**SM(ES-MS) : 477,3 (M-1).**

- 10 Compuesto 4 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



Este compuesto se preparó según el procedimiento general D, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 3 equivalentes de borohidruro sódico;

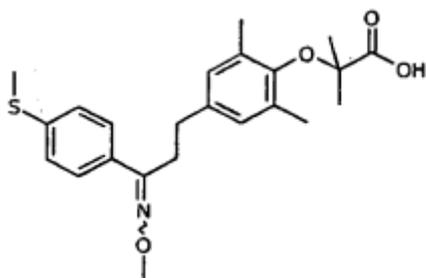
Aspecto: sólido amarillento; P.F. = 49-51°C

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) : 1,52 (s, 6H), 2,04 (m, 2H), 2,22 (s, 6H), 2,5 (s, 3H), 2,63 (m, 2H), 4,66 (dd, 1H,  $J=5,7\text{Hz}$ ,  $J=7,5\text{Hz}$ ), 6,84 (s, 2H), 7,27 (m, 4H).**

**SM(ES-MS) : 389,3 (M+1).**

15

- Compuesto 5: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-metoxiimino-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



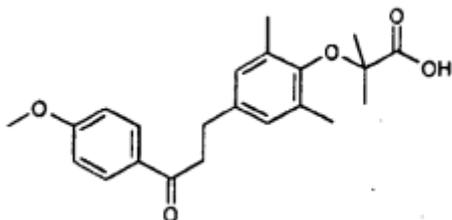
Este compuesto se preparó según el procedimiento general C, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;

- 20 Aspecto: aceite viscoso amarillento.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,50 (s, 6H), 2,21 (s, 6H), 2,49 (s, 3H), 2,73 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 3,99 (s, 3H), 6,84 (s, 2H), 7,20 (d, 2H, J=8,47Hz), 7,51 (d, 2H, J=8,47Hz).

SM(MALDI TOF) : 416,4 (M+1).

Compuesto 6 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



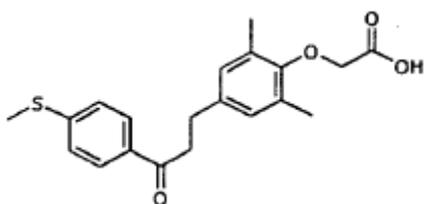
- 5 Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metoxi)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco; P.F. = 279-281°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,52 (s, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,94 (t, 2H, J=7,59 Hz), 3,20 (t, 2H, J=7,59Hz), 3,87 (s, 3H), 6,88 (s, 2H), 6,93 (d, 2H, J=8,76Hz), 7,95 (d, 2H, J=8,76Hz).

SM(ES-MS) : 369,3 (M-1).

- 10 Compuesto 7 de la invención: Ácido 2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi-etanoico



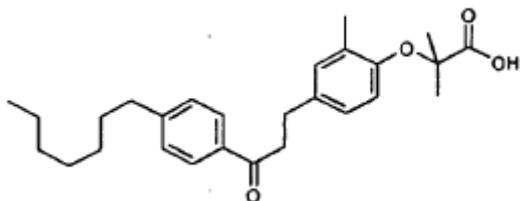
Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi-etanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco; P.F. = 138-139°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 2,28 (s, 6H), 2,54 (s, 3H), 2,96 (t, 2H, J=7,60Hz), 3,24 (t, 2H, J=7,60Hz), 4,45 (s, 2H), 6,92 (s, 2H), 7,27 (d, 2H, J=8,47Hz), 7,88 (d, 2H, J=8,47Hz).

- 15 SM(ES-MS) : 357,2 (M-1).

Compuesto 8 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



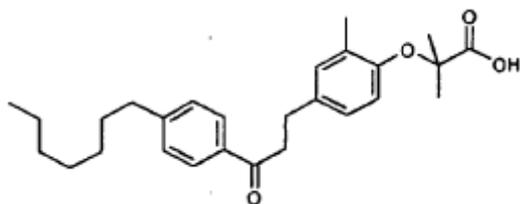
Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

5 Aspecto: sólido blanco; P.F. = 89-92°C.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 1,06 (t, 3H,  $J=7,30\text{Hz}$ ), 1,54 (s, 6H), 1,85 (m, 2H), 2,23 (s, 6H), 2,95 (t, 2H,  $J=7,75\text{Hz}$ ), 3,22 (t, 2H,  $J=7,75\text{Hz}$ ), 3,99 (t, 2H,  $J=6,57\text{Hz}$ ), 6,89 (s, 2H), 6,93 (d, 2H,  $J=8,91\text{Hz}$ ), 7,95 (d, 2H,  $J=8,91\text{Hz}$ ).

SM(ES-MS) : 397,3 (M-1).

Compuesto 9: Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(heptil)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



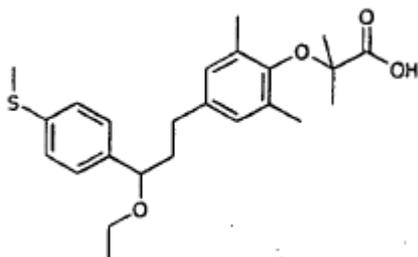
10 Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(heptil)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco; P.F. = 53-54°C.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 0,89 (t, 3H,  $J=6,72\text{Hz}$ ), 1,29 (m, 8H), 1,61 (s, 6H), 1,62 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,66 (t, 2H,  $J=7,74\text{Hz}$ ), 2,99 (t, 2H,  $J=7,59\text{Hz}$ ), 3,26 (t, 2H,  $J=7,59\text{Hz}$ ), 6,78 (d, 1H,  $J=8,46\text{Hz}$ ), 7,01 (d, 1H,  $J=8,46\text{Hz}$ ), 7,08 (s, 1H), 7,26 (d, 2H,  $J=8,16\text{Hz}$ ), 7,89 (d, 2H,  $J=8,16\text{Hz}$ ).

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

15 Compuesto 10 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-etiloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



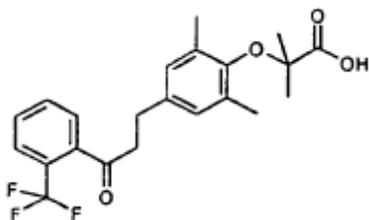
Este compuesto se preparó según el procedimiento general E, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxiopropil]fenoxi]-2-metil-propanoico a reflujo de una mezcla de etanol/agua 2/3:1/3 durante 72 horas;

Aspecto: aceite viscoso.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,19 (t, 3H, J=7,02Hz), 1,48 (s, 6H), 1,87 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 2,19 (s, 6H), 2,5 (s, 3H), 2,53 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 3,34 (m, 2H), 4,14 (dd, 1H, J=2,34Hz, J=5,55Hz), 6,8 (s, 2H), 7,24 (m, 4H).

SM(ES-MS) : 417,4 (M+1).

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



Este compuesto se preparó según el procedimiento general A, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(trifluorometil)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, a través de 1 equivalente de trietilsilano;

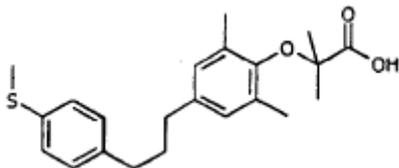
Aspecto: aceite viscoso amarillento.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,53 (s, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,95 (t, 2H, J=7,30Hz), 3,15 (t, 2H, J=7,30Hz), 6,86 (s, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,71 (m, 1H).

SM(ES-MS) : 407,3 (M-1).

10

Compuesto 12: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



El ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico se disuelve en ácido trifluoroacético. Se agrega trietilsilano (2,7 equivalentes) gota a gota. El conjunto se agita a temperatura ambiente durante 16 h y la progresión de la reacción se sigue por cromatografía de capa fina. Una vez que se ha consumido el producto de partida, el medio se lava con agua. La fase acuosa se extrae con diclorometano, se combinan las fases orgánicas, se secan sobre sulfato de magnesio y el disolvente se retira por evaporación a presión reducida. El residuo de evaporación se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano 95, metanol 5).

15

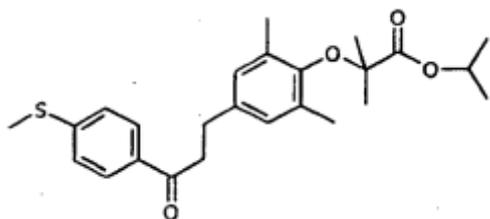
Aspecto: sólido blanco; P.F. = 181-182°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) : 1,24 (s, 6H), 1,81 (m, 2H), 2,16 (s, 6H), 2,42 (m, 2H), 2,44 (s, 3H), 2,54 (m, 2H), 6,73 (s, 2H), 7,15 (m, 4H).

20

SM(ES-MS) : 371,4 (M-1).

Compuesto 13 de la invención: 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoato de isopropilo



Este compuesto se preparó según el procedimiento general A, a partir del 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoato de isopropilo, por medio de 1 equivalente de trietilsilano;

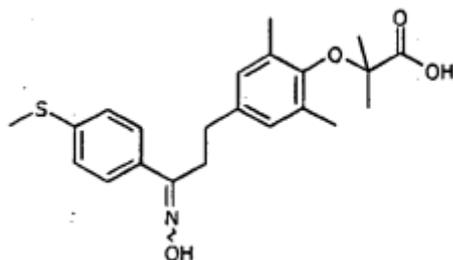
Aspecto: sólido blanco; P.F. = 64-65°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,34 (d, 6H, J=6,15Hz), 1,45 (s, 6H), 2,19 (s, 6H), 2,54 (s, 3H), 2,93 (t, 2H, J=7,89Hz), 3,21 (t, 2H, J=7,89Hz), 5,14 (sep, 1H, J=6,15Hz), 6,84 (s, 2H), 7,26 (d, 2H, J=8,49Hz), 7,89 (d, 2H, J=8,49Hz).

SM(MALDI-TOF) : 429,3 (M+1).

5

Compuesto 14: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxiimino-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



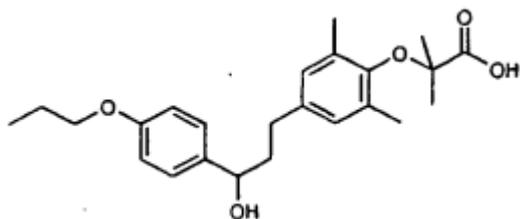
Este compuesto se preparó según el procedimiento general C, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;

10 Aspecto: sólido blanco; P.F. = 144-147°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) : 1,31 (s, 6H), 2,11 (s, 6H), 2,49 (s, 3H), 2,61 (dd, 2H, J=7,17Hz, J=8,76Hz), 2,91 (t, 2H, J=8,47Hz), 6,85 (s, 2H), 7,23 (d, 2H, J=8,47Hz), 7,54 (d, 2H, J=8,47Hz), 11,21 (s, 1H), 12,81 (s, 1H).

SM(ES-MS) : 400,3 (M-1).

Compuesto 15 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



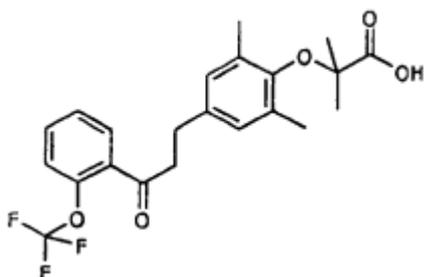
Este compuesto se preparó según el procedimiento general D, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;

Aspecto: aceite viscoso amarillento.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,05 (t, 3H, J=7,46Hz), 1,50 (s, 6H), 1,82 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 2,20 (s, 6H), 2,56 (m, 2H), 3,93 (t, 2H, J= 6,57Hz), 4,63 (t, 1H, J=6,57Hz), 6,81 (s, 2H), 6,88 (d, 2H, J=8,61Hz), 7,25 (d, 2H, J=8,61Hz).

SM(ES-MS) : 399,4 (M-1).

5 Compuesto 16. Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



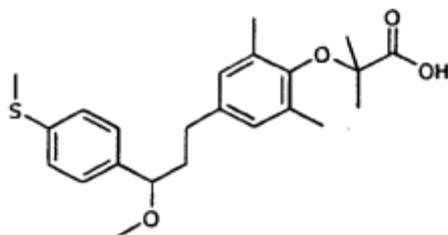
Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(trifluorometoxi)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

10 Aspecto: aceite viscoso amarillento.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,53 (s, 6H), 2,21 (s, 6H), 2,94 (t, 2H, J=7,46Hz), 3,23 (t, 2H, J=7,46Hz), 6,85 (s, 2H), 7,36 (m, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,63 (dd, 1H, J=1,74Hz, J=7,59Hz).

SM(ES-MS) : 423,0 (M-1).

Compuesto 17 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-metoxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



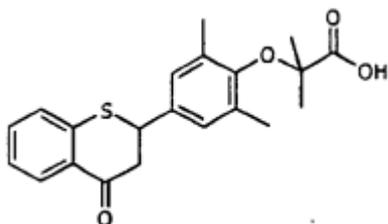
15 Este compuesto se preparó según el procedimiento general E, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico a reflujo de una mezcla de metanol/agua 2/3:1/3 durante 16 horas;

Aspecto: aceite viscoso.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,51 (s, 6H), 1,89 (m, 1H), 2,08 (m, 1H), 2,21 (s, 6H), 2,5 (s, 3H), 1,56 (m, 2H), 3,22 (s, 3H), 4,05 (dd, 1H, J=5,82Hz, J=7,32Hz), 6,79 (s, 2H), 7,26 (d, 2H, J=8,46Hz), 7,21 (d, 2H, J=8,46Hz).

SM(ES-MS) : 401,3 (M-1).

Compuesto 18: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[2,3-dihidro-4H-1-benzotiopiran-4-ona-2-il]fenoxi]-2-metil-propanoico



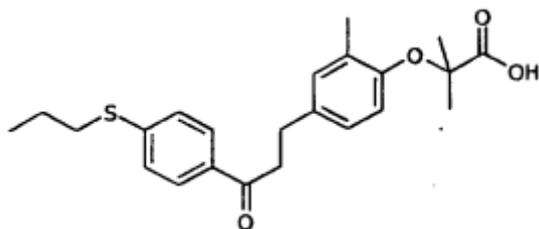
5 Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[2-(metiltio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 6 equivalentes de yoduro sódico y 6 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido amarillento; P.F = 60-63°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,53 (s, 6H), 2,26 (s, 6H), 3,18 (dd, 1H, J=3,35Hz, J=16,37Hz), 3,28 (dd, 1H, J=12,87Hz, J=16,37Hz), 4,62 (dd, 1H, J=3,35Hz, J=12,87Hz), 7,06 (s, 2H), 7,22 (d, 1H, J=7,02Hz), 7,29 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 8,15 (d, 1H, J= 7,89Hz).

SM(ES-MS): 369,1 (M-1).

Compuesto 19: Ácido 2-[2-metil-4-[3-[4-(propiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



10

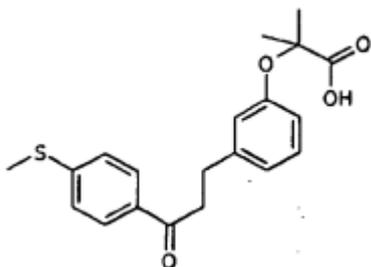
Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del 2-metil-2-(2-metil-4-(3-oxo-3-(4-(propiltio)fenil)prop-1-enil)fenoxi)propanoato de terc-butilo, por medio de 3 equivalentes de yoduro sódico y 3 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: aceite viscoso.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,07 (t, 3H, J=7,3Hz), 1,61 (s, 6H), 1,73 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,98 (m, 4H), 3,23 (t, 2H, J=7,32Hz), 6,76 (d, 1H, J=8,19Hz), 6,97 (d, 1H, J=8,19Hz), 7,06 (s, 1H), 7,29 (d, 2H, J=8,76Hz), 7,86 (d, 2H, J=8,76Hz).

SM(ES-MS) : 392,2 (M-1).

Compuesto 20: Ácido 2-[3-[3-[4-metiltiofenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



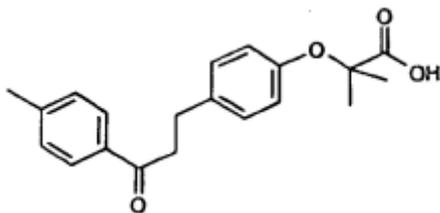
5 Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[3-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 7 equivalentes de yoduro sódico y 7 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco; P.F. = 67-68°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,62 (s, 6H), 2,51 (s, 3H), 3,01 (t, 2H, J= 7,60Hz), 3,23 (t, 2H, J=7,60Hz), 6,76 (d, 1H, J=8,16Hz), 6,86 (s, 1H), 6,93 (d, 1H, J=7,62Hz), 7,16 (t, 1H, J=7,89Hz), 7,25 (d, 2H, J=8,48Hz), 7,85 (d, 2H, J=8,48Hz).

SM(ES-MS) : 357,3 (M-1).

Compuesto 21: Ácido 2-[4-[3-[4-metilfenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico



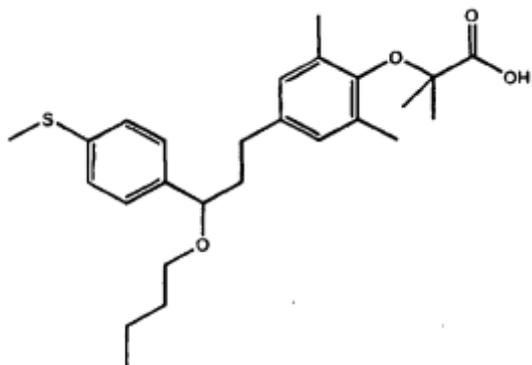
10 Este compuesto se preparó según el procedimiento general B, a partir del ácido 2-[4-[3-[4-metilfenil]-3-oxo-prop-2-enil]fenoxi]-2-metil-propanoico, por medio de 5 equivalentes de yoduro sódico y 5 equivalentes de tetraclorosilano;

Aspecto: sólido blanco; P.F. = 124-125°C.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,56 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 3,04 (t, 2H, J=7,52Hz), 3,27 (t, 2H, J=7,52Hz), 6,9 (d, 2H, J=8,34Hz), 7,19 (d, 2H, J=8,34Hz), 7,24 (d, 2H, J=8,19Hz), 7,87 (d, 2H, J=8,19Hz).

SM(ES-MS) : 325,3 (M-1).

Compuesto 23 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-butiloxipropil]fenoxi]-2-metil-propanoico



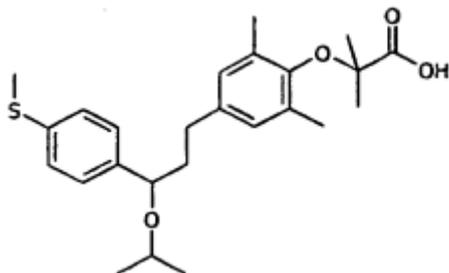
Este compuesto se preparó según el procedimiento general E, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxy]-2-metil-propanoico, por medio de una mezcla de butanol/agua 50/50 calentada a 70°C durante 32 horas;

5 Aspecto: aceite viscoso.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 0,81 (t, 3H, J=8,72Hz), 1,38 (m, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,51 (s, 6H), 1,86 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 2,21 (s, 6H), 2,5 (s, 3H), 2,55 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 4,13 (m, 1H), 6,81 (s, 2H), 7,24 (m, 4H).

SM(ES-MS) : 443,5 (M-1).

Compuesto 24 de la invención: Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-isopropil-oxipropil]fenoxy]-2-metil-propanoico



10 Este compuesto se preparó según el procedimiento general E, a partir del ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxy]-2-metil-propanoico, por medio de una mezcla de alcohol isopropílico/agua 50/50 calentada a 70°C durante 32 horas;

Aspecto: aceite viscoso.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) : 1,09 (d, 3H, J=6,12Hz), 1,14 (d, 3H, J=6,12Hz), 1,5 (s, 6H), 1,79-1,90 (m, 1H), 1,97-2,09 (m, 1H), 2,2 (s, 6H), 2,44-2,54 (m, 1H), 2,5 (s, 3H), 2,67 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 4,27 (dd, 1H, J=5,27Hz, J=8,17Hz), 6,82 (s, 2H), 7,24 (s, 4H).

SM(ES-MS) : 429,3 (M-1).

Los compuestos 22 y 25 se sintetizaron según uno de los protocolos A hasta E de la forma descrita para los compuestos 1-21 y 23-24.

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

Las propiedades de activación de PPARs de los compuestos según la invención se evalúan *in vitro*.

5 Principio

La activación de los PPARs se evalúa *in vitro* en una línea de fibroblastos renales de mono (COS-7), midiendo la actividad transcripcional de quimeras formadas por el dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 de la levadura y el dominio de unión al ligando de diferentes PPARs. Los compuestos se ensayan a dosis comprendidas entre  $10^{-7}$  y 100  $\mu$ M sobre quimeras de Gal4-PPAR $_{\alpha,\gamma,\delta}$ .

10 Protocolo

Cultivo de las células

Las células COS-7 proceden de la ATCC y se cultivan en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina (Gibco, Paisley, RU) y L-glutamina 2 mM (Gibco, Paisley, RU). Las células se incuban a 37°C en atmósfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>.

15 Descripción de los plásmidos utilizados en la transfección

En la bibliografía se han descrito los plásmidos Gal4(RE)\_TkpGL3, pGal4-hPPAR $_{\alpha}$ , pGal4-hPPAR $_{\gamma}$ , pGal4-hPPAR $_{\delta}$  y pGal4- $\Phi$  (Raspe, E. et al., 1999). Las construcciones 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 PCR, correspondientes a los dominios DEF de los receptores nucleares PPAR $_{\alpha}$ , PPAR $_{\gamma}$  y PPAR $_{\delta}$  humanos.

20 Transfección

Las células COS-7 en suspensión se someten a transfección con 150 ng de ADN por pocillo, con una proporción de pGal4-PPAR/Gal4(RE)\_TkpGL3 de 1/10, en presencia de 10% de suero bovino fetal. A continuación, las células se siembran en placas de 96 pocillos ( $4 \times 10^4$  células/pocillo) y se incuban durante 24 horas a 37°C. La activación con los compuestos ensayados se efectúa durante 24 h a 37°C en un medio libre de suero. Al finalizar el experimento, las células se lisan y se determina la actividad de luciferasa con ayuda del sistema *Steady-Lite*<sup>®</sup> HTS (Perkin Elmer) o *Steady Glow Luciferase* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

25

Resultados

Los compuestos según la invención se ensayaron sobre las 3 isoformas de PPAR. Los resultados obtenidos con los compuestos 1 a 12, 14, 16 a 25 se describen de manera detallada en las figuras (1-1) a (1-66).

30

Conclusión

De forma inesperada, los datos experimentales que se presentan demuestran que los compuestos según la invención se fijan *in vitro* a los PPARs e inducen una activación de la actividad transcripcional.

35

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

Principio

Las propiedades hipolipemiantes de los compuestos según la invención se evalúan *in vivo* mediante la concentración de los lípidos plasmáticos y el análisis de la expresión génica de los genes diana de los PPARs en el hígado, después del tratamiento del ratón E2/E2 dislipidémico con los compuestos según la invención.

40

El modelo murino usado es el ratón de tipo ApoE2/E2, ratón transgénico para la isoforma E2 de la apolipoproteína E humana (Sullivan, PM. et al.). En el hombre, esta apolipoproteína, que forma 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 posición 158, lo cual debilita considerablemente la afinidad de esta proteína por el receptor en LDL. Por este motivo, el aclaramiento de VLDL es prácticamente nulo. Se produce, entonces, una acumulación de

45

lipoproteínas de baja densidad y una hiperlipidemia mixta, denominada de tipo III (elevación del colesterol y triglicéridos).

- 5 PPAR $\alpha$  regula la expresión de los genes implicados en el transporte de lípidos (apolipoproteínas tales como Apo AI, Apo AII y Apo AIII, transportadores de membrana tales como FAT), o en el catabolismo de lípidos (ACO, CPT-I o CPT-II, enzimas de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos). Por lo tanto, el tratamiento con activadores de PPAR $\alpha$  se traduce, tanto en el ser humano como en el roedor, en una reducción de las concentraciones circulantes de triglicéridos. En consecuencia, la medición de los lípidos plasmáticos después del tratamiento con los compuestos según la invención será un indicador del carácter agonista de PPAR y, por tanto, del carácter hipolipemiente de los compuestos según la invención.
- 10 El tratamiento con activadores de PPARs se traduce también en ocasiones, tanto en el ser humano como en el roedor, en un aumento de la concentración de colesterol HDL en plasma. Por lo tanto, la medición de las concentraciones plasmáticas de colesterol HDL permite poner de manifiesto el carácter estimulante de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención.
- 15 Las propiedades agonistas de PPAR $\alpha$  medidas previamente *in vitro* se deben traducir a nivel hepático en una sobreexpresión de los genes diana bajo control directo del receptor de PPAR $\alpha$ : los genes estudiados por los presentes inventores son PDK-4 (Piruvato Deshidrogenasa Quinasa, isoforma 4, enzima del metabolismo de glúcidos), Apo CIII (apolipoproteína que interviene en el metabolismo lipídico) y Acox1 (la Acox1 presente en el ratón corresponde al gen de ACO en el hombre (Acil-Coenzima A Oxidasa, una enzima clave en el mecanismo de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos)). Por consiguiente, la medición de la actividad transcripcional de los genes diana de PPAR $\alpha$  después del tratamiento con los compuestos según la invención será también un indicador del carácter hipolipemiente de los compuestos según la invención.
- 20

#### Protocolo

##### Tratamiento de los animales

- 25 Los ratones transgénicos ApoE2/E2 se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas a una temperatura constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Después de una semana de aclimatación, los ratones fueron pesados y repartidos en grupos de 6 animales seleccionados de manera que la distribución de sus pesos corporales y de sus niveles de lípidos en plasma, determinados una primera vez antes del experimento, fueran uniformes. Los compuestos ensayados se suspendieron en carboximetilcelulosa (Sigma C4888) y se administraron a través de una sonda intragástrica a razón de una vez al día durante 8 días (para el compuesto 1) o 14 días (para el compuesto 8) a las dosis seleccionadas. Los animales tuvieron acceso libre al agua y a la alimentación (régimen estándar). A lo largo de todo el experimento, se registran la toma de alimento y el aumento de peso. Al final del experimento, los animales fueron anestesiados después de un ayuno de 4 horas, se tomó una muestra de sangre sobre anticoagulante (EDTA), se les pesó y fueron sacrificados por eutanasia. Se separó el plasma por centrifugación a 3.000 revoluciones/min durante 20 minutos y las muestras se conservaron a  $+4^\circ\text{C}$ .
- 30
- 35 Se tomaron muestras del hígado, que se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  para análisis posteriores.

##### Medición de los lípidos plasmáticos

- Las concentraciones plasmáticas de lípidos (colesterol total y triglicéridos) se midieron por análisis enzimático (bioMérieux, Lyon, Francia) según las instrucciones del fabricante.
- 40 Las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos se miden después de 8 ó 14 días de tratamiento por vía oral con los compuestos según la invención; se comparan estos valores con los obtenidos en los animales de control (no tratados con los compuestos según la invención): la diferencia medida demuestra el efecto hipolipemiente de los compuestos según la invención.

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

- 45 El ARN total se extrae a partir de fragmentos de hígado, utilizando el kit NucleoSpin® 96 RNA (Macherey Nagel, Hoerd, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- A continuación, se lleva a cabo la transcripción inversa de 1  $\mu\text{g}$  de ARN total (cuantificado con el uso del kit de cuantificación Ribogreen RNA (Molecular Probes)) en ADN complementario por la reacción durante 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 la RNasa (Sigma) y 1  $\mu\text{l}$  de MMLV-RT (Sigma).
- 50

Los experimentos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo usando el Sistema de Detección MyiQ Single-Color Real-Time PCR (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se efectuaron utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix según las instrucciones del fabricante, en placas de 96 pocillos, sobre 5 µl de reacciones de transcripción inversa diluidas, con una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron pares de cebadores específicos de los genes estudiados:

- 5
- PDK4: cebador sentido: 5'-TACTCCACTGCTCCAACACCTG-3' (SEC ID NO: 1) y cebador antisentido 5'-GTTCTTCGGTTCCTGCTTG-3' (SEC ID NO: 2);
  - ApoCIII: cebador sentido: 5'-CTCTTGGCTCTCCTGGCATC-3' (SEC ID NO: 3) y cebador antisentido 5'-GCATCCTGGACCGTCTTGA-3' (SEC ID NO: 4);
- 10
- ACO: cebador sentido: 5'-GAAGCCAGCGTTACGAGGTG-3' (SEC ID NO: 5) y cebador antisentido 5'-TGGAGTTCTTGGGACGGGTG-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 amplificado en el transcurso de la PCR. Para cada diana estudiada se realizó una escala por medio de diluciones sucesivas de un pool formado por algunos µl de reacciones diferentes de transcripción inversa. De este modo, se determinan los niveles de expresión relativos de cada diana usando las curvas de eficacia obtenidas con los puntos de la escala.

15

Seguidamente, se homologan los niveles de expresión de los genes de interés en relación con el nivel de expresión del gen de referencia 36B4 (cuyos cebadores específicos son: cebador sentido: 5'-CATGCTCAACATCTCCCCTTCTCC-3' (SEC ID NO: 79) y cebador antisentido: 5'-GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG-3' (SEC ID NO: 10)).

20 A continuación, se calcula para cada muestra 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 control. 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.

Resultados

25 Medición de lípidos plasmáticos

La Figura 2-1 compara la concentración plasmática de colesterol total después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk, con las concentraciones obtenidas en los animales de control. De manera inesperada, el tratamiento redujo muy significativamente las concentraciones circulantes de colesterol total.

30 La Figura 2-2 compara la concentración plasmática de triglicéridos después de 8 días de tratamiento con el compuesto 1, administrado a 50 mpk, con las concentraciones obtenidas en los animales de control. De manera inesperada, el tratamiento redujo muy significativamente las concentraciones circulantes de triglicéridos.

La Figura 2-3 compara la concentración plasmática de colesterol total después de 14 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk, con las concentraciones obtenidas en los animales de control. De manera inesperada, el tratamiento redujo muy significativamente las concentraciones circulantes de colesterol total.

35 Análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa

Del mismo modo, los inventores han puesto de manifiesto que los compuestos según la invención actúan, *in vivo*, como reguladores de la expresión de genes diana de los PPARs. Los resultados que se presentan en las Figuras 2-4, 2-5 y 2-6 demuestran que el compuesto 1, administrado a 50 mpk durante 8 días a ratones E2/E2, provoca un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (Figura 2-4), una disminución de la expresión hepática del gen que codifica ApoCIII (Figura 2-5), y un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican ACO (Figura 2-6).

40

Los resultados que se presentan en las Figuras 2-7, 2-8 y 2-9 demuestran que el compuesto 8, administrado a 3 y 10 mpk durante 14 días a ratones E2/E2, provoca un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (Figura 2-7), una disminución de la expresión hepática del gen que codifica ApoCIII (Figura 2-8), y un aumento significativo de la expresión de los genes que codifican ACO (Figura 2-9).

45

El conjunto de estos genes codifica enzimas que intervienen de forma destacada en el metabolismo de lípidos y glúcidos, y el hecho de que su expresión esté modulada por los compuestos según la invención refuerza la idea de que los compuestos según la invención exhiben un interés potencial mayor en el marco de las patologías metabólicas.

Conclusión

- 5 De manera inesperada, los datos experimentales que se presentan demuestran que los compuestos según la invención inducen un efecto hipolipemiente (disminución de las concentraciones plasmáticas de colesterol total y triglicéridos). Adicionalmente, los datos experimentales indicados demuestran que los compuestos según la invención modulan la expresión de genes regulados por la activación de los PPARs que codifican enzimas fuertemente implicadas en el metabolismo de lípidos y glúcidos.

Ejemplo 5: Evaluación *in vivo*, en el ratón db/db, de las propiedades hipolipemiantes y estimulantes de la síntesis de colesterol HDL de los compuestos según la invención

Principio

- 10 Las propiedades hipolipemiantes de los compuestos según la invención se evalúan *in vivo*, midiendo las concentraciones en plasma de los lípidos plasmáticos y analizando la expresión génica de los genes diana de los PPARs después del tratamiento por vía oral del ratón db/db con los compuestos según la invención.

Protocolo

Tratamiento de los animales

- 15 Ratones hembras db/db se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas a una temperatura constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Después de una semana de aclimatación, los ratones fueron pesados y repartidos en grupos de 8 animales seleccionados de manera que la distribución de sus pesos corporales y de sus niveles de lípidos en plasma, determinados una primera vez antes del experimento, fueran uniformes. Los compuestos ensayados se suspendieron en carboximetilcelulosa (Sigma C4888) y se administraron a través de una sonda intragástrica a razón de una vez al día durante 28 días a la dosis seleccionada. Los animales tuvieron acceso libre al agua y a la alimentación (régimen estándar). A lo largo de todo el experimento, se registran la toma de alimento y el aumento de peso. Al final del experimento, los animales fueron anestesiados después de un ayuno de 4 horas, se tomó una muestra de sangre sobre anticoagulante (EDTA), se les pesó y fueron sacrificados por eutanasia. Se separó el plasma por centrifugación a 3.000 revoluciones/min durante 20 minutos y las muestras se conservaron a  $+4^\circ\text{C}$ .
- 20
- 25 Se tomaron muestras de tejido hepático y de tejido muscular esquelético, que se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y, a continuación, se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  para análisis posteriores.

Medición de los lípidos plasmáticos

Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos se miden por análisis enzimático (bioMérieux, Lyon, Francia) según las instrucciones del fabricante.

- 30 Medición del colesterol HDL

Las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL) precipitan por medio de fosfotungstato. El precipitado se elimina por centrifugación. El colesterol HDL presente en el sobrenadante se cuantifica por análisis enzimático (bioMérieux, Lyon, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de expresión génica por RT-PCR cuantitativa

- 35 Tejido hepático

El ARN total se extrajo a partir de fragmentos de hígado, usando el kit NucleoSpin® 96 RNA (Macherey Nagel, Hoerd, Francia), según las instrucciones del fabricante.

Tejido esquelético

- 40 El ARN total se extrajo a partir de fragmentos del músculo esquelético gastrocnemio, usando el kit RNeasy® Fibrous Tissue kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

A continuación, se sometió 1  $\mu\text{g}$  de ARN total (cuantificado por espectrofotometría) a transcripción 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 contuvo 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  $\mu\text{l}$  de MMLV-RT (Sigma).

- 45 Los experimentos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo usando el Sistema de Detección MyiQ Single-Color Real-Time PCR (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se efectuaron utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix según

las instrucciones del fabricante, en placas de 96 pocillos, sobre 5 µl de reacciones de transcripción inversa diluidas, con una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron pares de cebadores específicos de los genes estudiados.

- PDK4: cebador sentido: 5'-TACTCCACTGCTCCAACACCTG-3' (SEC ID NO: 1) y cebador antisentido 5'-GTTCTTCGGTTCCTGCTTG-3' (SEC ID NO: 2);
- 5 • ACO: cebador sentido: 5'-GAAGCCAGCGTTACGAGGTG-3' (SEC ID NO: 5) y cebador antisentido 5'-TGGAGTTCTTGGGACGGGTG-3' (SEC ID NO: 6)
- UCP2: cebador sentido: 5'-GTCGGAGATACCAGAGCACTGTGCG-3' (SEC ID NO: 7) y cebador antisentido 5'-CACATCAACAGGGGAGGCGA-3' (SEC ID NO: 8)

10 La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN complementario presente al inicio de la reacción y amplificado en el transcurso de la PCR. Para cada diana estudiada se realizó una escala por medio de diluciones sucesivas de un pool formado por algunos microlitros de reacciones diferentes de transcripción inversa. De este modo, se determinan los niveles de expresión relativos de cada diana usando las curvas de eficacia obtenidas con los puntos de la escala.

15 Seguidamente, se homologaron los niveles de expresión de los genes de interés, en el tejido hepático, en relación con el nivel de expresión del gen de referencia 36B4 (cuyos cebadores específicos son: cebador sentido: 5'-CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC-3' (SEC ID NO: 9) y cebador antisentido: 5'-GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG-3' (SEC ID NO: 10) y, en el tejido muscular esquelético, en relación con el nivel de expresión del gen de referencia 18S (cuyos cebadores específicos son: cebador sentido: 5'-CGGACACGGACAGGATTGACAG-3' (SEC ID NO:11) y el cebador antisentido: 5'-AATCTCGGGTGGCTGAACGC-3' (SEC ID NO: 12). A continuación, se calculó para cada muestra 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 la media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

## Resultados

### Medición de los lípidos plasmáticos

25 La Figura 3-1 compara las concentraciones en plasma de colesterol HDL después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8, administrado a 50 mpk, con las concentraciones obtenidas en los animales de control. De manera inesperada, la concentración de colesterol HDL estuvo significativamente aumentada.

30 Las Figuras 3-2 y 3-3 comparan las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y de ácidos grasos libres, después de 28 días de tratamiento con el compuesto 8 a 50 mpk con las concentraciones obtenidas en los animales de control. De manera inesperada, los tratamientos redujeron significativamente las concentraciones circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres.

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

35 Del mismo modo, los inventores han puesto de manifiesto que los compuestos según la invención actúan, *in vivo*, como reguladores de la expresión de genes diana de los PPARs. Los resultados que se presentan en las Figuras 3-4, 3-5 y 3-6 demuestran que el compuesto 8, administrado a 50 mpk durante 28 días a ratones db/db, induce un aumento significativo de la expresión hepática de los genes que codifican PDK4 (Figura 3-4) y ACO (Figura 3-5), así como un aumento de la expresión en el músculo esquelético del gen que codifica UCP2 (Figura 3-6). El conjunto de estos genes codifica enzimas que intervienen de forma destacada en el metabolismo de lípidos, de glúcidos y en la disipación de energía, y el hecho de que su expresión esté modulada por los compuestos según la invención refuerza la idea de que los compuestos según la invención presentan un interés potencial mayor en el marco de las patologías metabólicas.

### Conclusión

45 De manera inesperada, los datos experimentales que se presentan demuestran que los compuestos según la invención estimulan *in vivo* la síntesis de colesterol HDL paralelamente a un efecto hipolipemiante (disminución de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y ácidos grasos libres). Además, los datos experimentales indicados demuestran que los compuestos según la invención modulan la expresión de genes regulados por la activación de los PPARs que codifican enzimas fuertemente implicadas en el metabolismo de lípidos, glúcidos y en la disipación de energía.

Ejemplo 6: Evaluación *in vitro* de las propiedades antiinflamatorias de los compuestos según la invención

Principio

5 Los efectos antiinflamatorios de los compuestos según la invención se evaluaron midiendo la secreción de MCP1 (Proteína Quimiotáctica de los Monocitos-1) en monocitos THP1 tratados durante 24 horas con compuestos según la invención y estimulados, simultáneamente, con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, que provoca una respuesta inflamatoria de las células y su diferenciación en macrófagos). Cuanto mayor sea la reducción de cantidad de MCP1 secretada, mayor será la intensidad con la que el compuesto según la invención inhibe la reacción inflamatoria.

Protocolo

Cultivo y tratamiento de las células THP-1

10 La línea de monocitos humanos THP-1 (procedentes de ATCC) se cultiva en medio RPMI1640 suplementado con Hepes 25 mM (Gibco; 42401-018), 1% de glutamina (Gibco; 25030-24), 1% de penicilina/estreptomina (Biochrom AG; A 2213) y 10% de suero bovino fetal descomplementado (SVF, Gibco; 26050-088).

15 Las células se siembran en placas de 24 pocillos (Primaria, BD Falcon) con una densidad de 870.000 células/pocillo y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h en un medio de cultivo que contiene 0,2% de suero bovino fetal en presencia de 5 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y compuesto 8 1 μM según la invención. El compuesto según la invención se disuelve en dimetil sulfóxido (DMSO, Fluka; 41640). Se compara el efecto de los compuestos según la invención con el efecto de DMSO solo.

Medición de la secreción de MCP1

Se recupera el medio de tratamiento y se mide la concentración de MCP1 usando el dispositivo Elisa "Human MCP-1 ELISA Set" (BD OptEIA; 555179), según las instrucciones del fabricante.

20 La MCP1 se fija sobre una placa y es reconocida por un anticuerpo específico anti-MCP1. Por su parte, el anticuerpo es específicamente reconocido por un segundo tipo de anticuerpo acoplado a una enzima peroxidasa. La coloración resultante de la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de MCP1 fijada, y se puede medir por espectrometría. Se forma una escala a partir de un punto de concentración conocido, que permite calcular la concentración de MCP1 de cada muestra.

25 A continuación, se calcula el factor de inducción, es decir, la relación entre la señal inducida por el compuesto según la invención y la señal del grupo de control. Cuanto menor sea este factor, mayor será el carácter inhibitor del compuesto sobre la secreción de MCP1. El resultado final se representa como la media de los valores de inducción de cada grupo experimental.

Resultados

30 Los inventores han demostrado, en monocitos *in vitro*, que los compuestos según la invención tienen efectos antiinflamatorios. Los resultados, que se presentan en la Figura 4-1, demuestran que el compuesto 8 según la invención, a 1 μM, induce una disminución significativa de la secreción monocítica de MCP1.

Conclusión

35 De manera inesperada, los datos experimentales presentados demuestran que los compuestos según la invención poseen una acción antiinflamatoria en los monocitos estimulados con PMA.

Conclusión general

40 Los inventores han demostrado que los compuestos según la invención tienen propiedades hipolipemiantes, que reducen las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos, así como propiedades que estimulan la síntesis de colesterol HDL. Adicionalmente, los inventores han demostrado que los compuestos según la invención regulan la expresión de los genes que codifican enzimas que intervienen directamente en el metabolismo de lípidos, glúcidos y la disipación de energía.

De igual modo, los inventores han demostrado que los compuestos según la invención exhiben propiedades antiinflamatorias.

45 Estos resultados, obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, confirman el potencial terapéutico de los compuestos según la invención frente a patologías importantes tales como dislipidemias, diabetes de tipo 2 y la obesidad.

Bibliografia

Fox-Tucker J, *The Cardiovascular Market Outlook to 2010*, BUSINESS INSIGHTS REPORTS, 2005, 1-174

Gross B, et al., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$ : A novel target for the reduction of atherosclerosis*, DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, 2005, 2 (3), 237-243

International Atherosclerosis Society, *Harmonized Clinical Guidelines on Prevention of Atherosclerotic Vascular Disease*, 2003,

Kota BP, 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 PPAR $\alpha$  in energy metabolism and vascular homeostasis*, J Clin Invest, 2006, 116 (3), 571-580

Lehrke M and Lazar MA, *The many faces of PPAR $\gamma$* , Cell, 2005, 123 (6), 993-9  
Liu Y and Miller A, *Ligands to peroxisome proliferator-activated receptors as therapeutic options for metabolic syndrome*, DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, 2005, 2 (3), 165-169

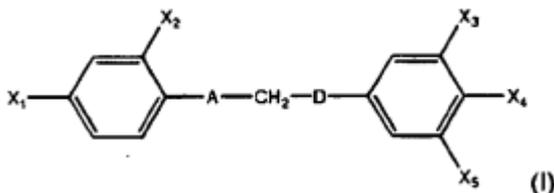
Mensah M, *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, 2004,

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



en la cual:

X1 significa un grupo R1 o G1-R1;

5 X2 significa un átomo de hidrógeno;

X3 significa un grupo R3;

X4 es un grupo G4-R4 en el que G4 significa un átomo de oxígeno;

X5 significa un grupo R5;

R1 significa un grupo alquilo no halogenado;

10 R3 y R5, idénticos o diferentes, significan un grupo alquilo no sustituido;

G1 significa un átomo de oxígeno o de azufre;

R4 significa un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR9;

A significa:

15 i) un grupo -CR6R7, en el que R6 significa un átomo de hidrógeno, R7 significa un grupo alquilo, un grupo hidroxilo o un grupo -OR8, en donde R8 significa un grupo alquilo, sustituido o no con un grupo arilo, heteroarilo o cicloalquilo; o

ii) un grupo carbonilo;

D significa un átomo de carbono unido a dos átomos de hidrógeno,

R9 significa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo no sustituido;

20 sus estereoisómeros, diastereoisómeros, enantiómeros, puros o mezclados, mezclas racémicas, isómeros geométricos, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, formas sólidas, así como sus mezclas.

2. Compuestos según la reivindicación 1, caracterizados por que A significa un grupo carbonilo (CO).

25 3. Compuestos según la reivindicación 1 ó 2, caracterizados por que X4 significa un grupo G4R4 en el que R4 significa un grupo alquilo que comprende 1 a 10 átomos de carbono y sustituido con un grupo -COOR9, en donde R9 es como se ha definido en la reivindicación 1.

4. Compuestos según la reivindicación 3, caracterizados por que X4 tiene la fórmula  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{COOR}_9$ , en donde R9 es como se ha definido en la reivindicación 1.

30 5. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que X3 y X5, idénticos o diferentes, significan respectivamente un grupo R3 y R5, en donde R3 y R5 significan un grupo alquilo no sustituido que comprende 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono.

6. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que X1 significa un grupo R1 o G1R1, en donde G1 es como se ha definido en la reivindicación 1, y R1 significa un grupo alquilo no halogenado, que comprende 1, 2 ó 3 átomos de carbono.

7. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados por que se seleccionan de:
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi-etanoico;
- 5    Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoato de isopropilo;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-ciclohexilmetoxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-butiloxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- 10   Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-isopropiloxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-ciclohexiletiloxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-benciloxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-hidroxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico;
- Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-etiloxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico; y
- 15   Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-metoxi-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico.
8. Composición farmacéutica que comprende, en un soporte farmacéuticamente aceptable, al menos un compuesto tal como se han definido en las reivindicaciones 1 a 7, eventualmente en asociación con uno o múltiples otros principios activos terapéuticos y/o cosméticos.
- 20   9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para el tratamiento de las complicaciones que se asocian con el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la diabetes, las 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.
- 25   11. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para tratar los factores de riesgo cardiovascular asociados con trastornos del metabolismo de lípidos y/o glúcidos.

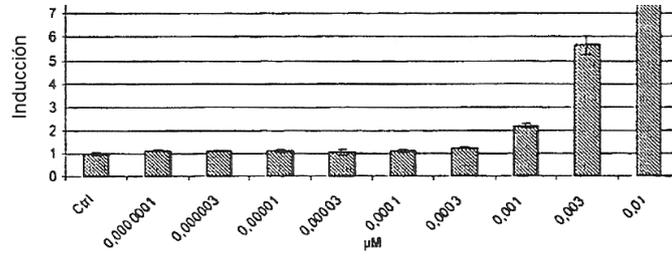


Figura 1-1

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 1

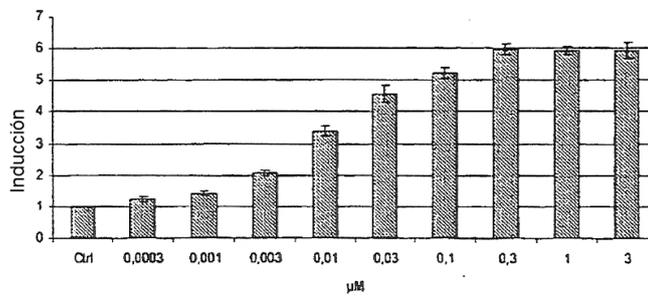


Figura 1-2

hGal4-PPARdelta  
Comp. 1

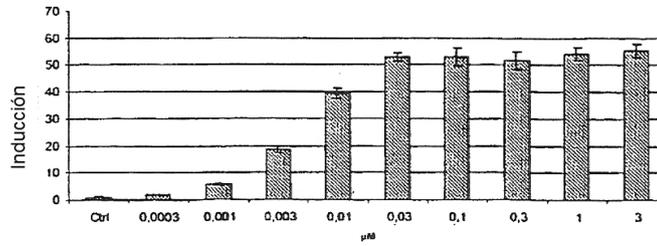


Figura 1-3

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 2

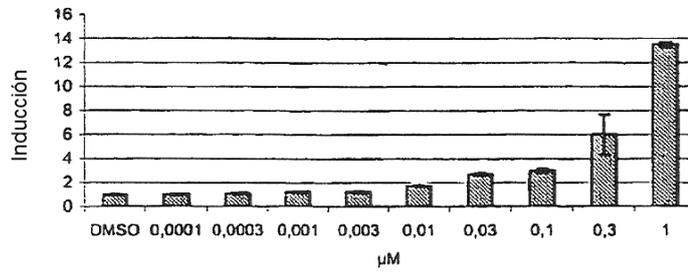


Figura 1-4

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 2

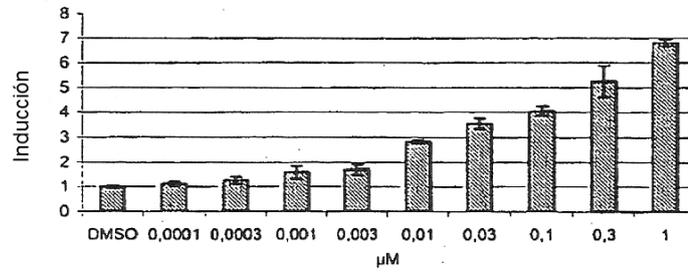


Figura 1-5

hGal4-PPAR delta  
Comp. 2

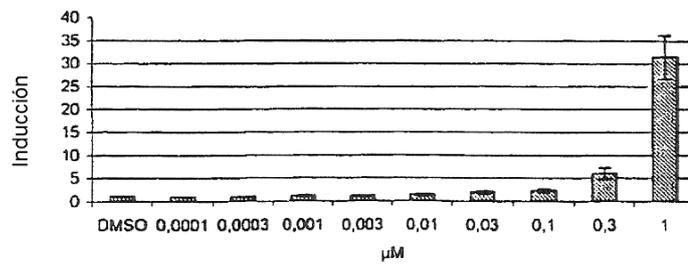


Figura 1-6

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 3

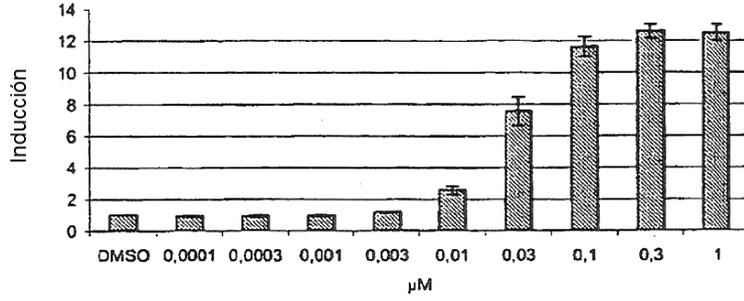


Figura 1-7

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 3

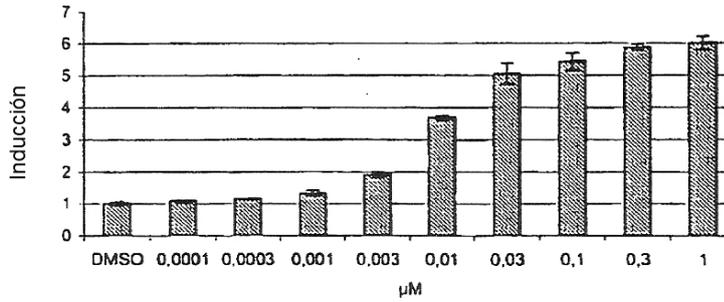


Figura 1-8

hGal4-PPAR delta  
Comp. 3

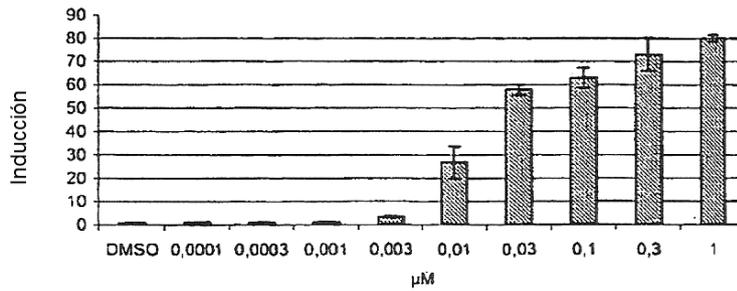
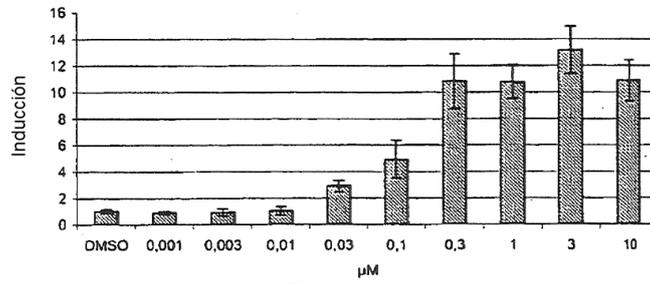


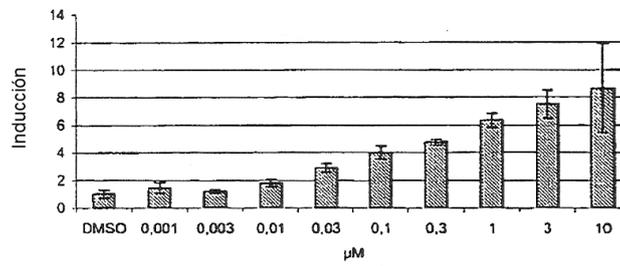
Figura 1-9

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 4



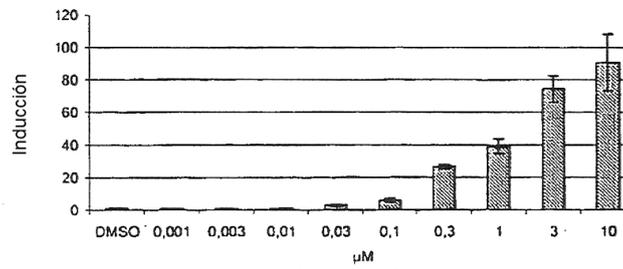
**Figura 1-10**

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 4



**Figura 1-11**

hGal4-PPAR delta  
Comp. 4



**Figura 1-12**

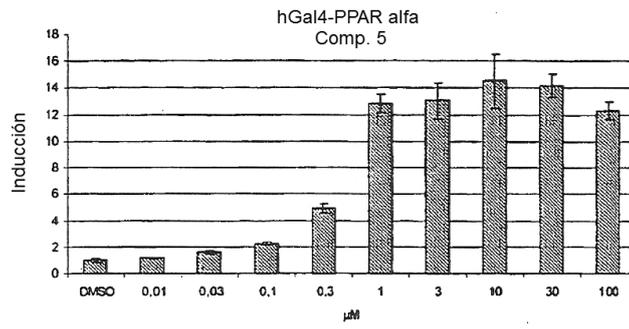


Figura 1-13

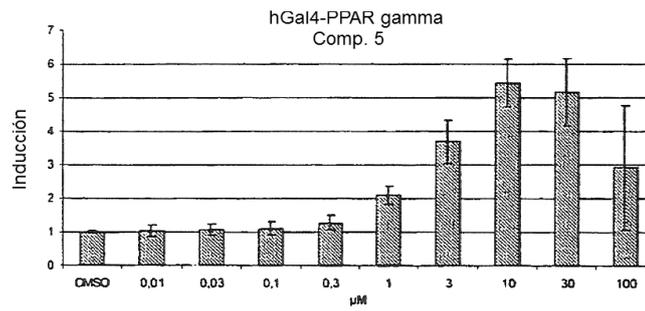


Figura 1-14

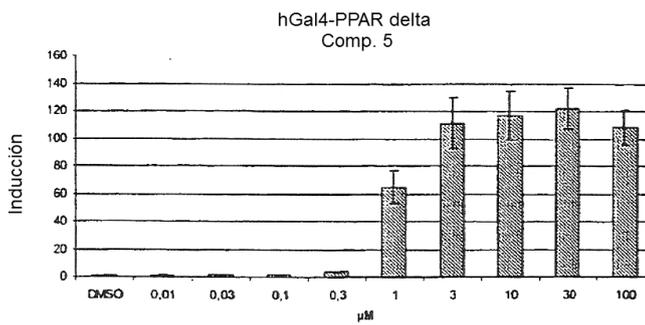


Figura 1-15

hGal-PPAR alfa  
Comp. 6

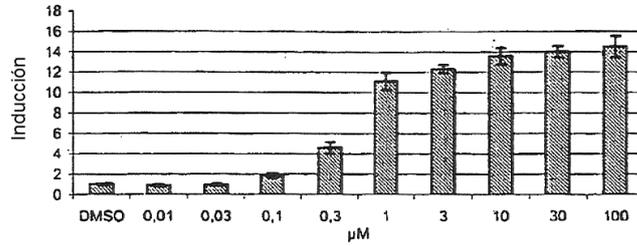


Figura 1-16

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 6

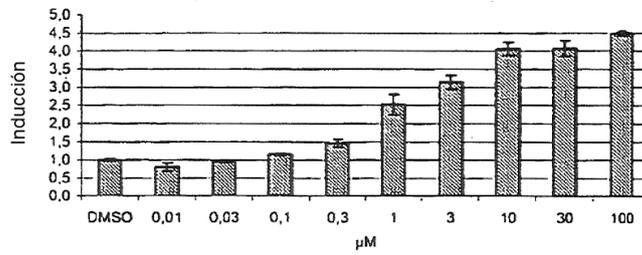


Figura 1-17

hGal4-PPAR delta  
Comp. 6

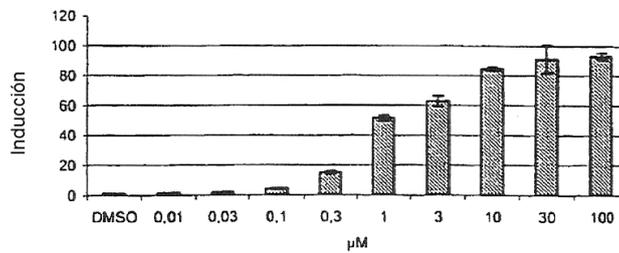


Figura 1-18

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 7

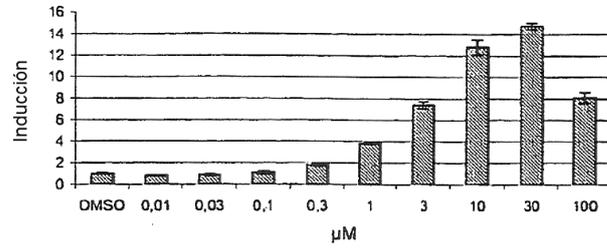


Figura 1-19

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 7

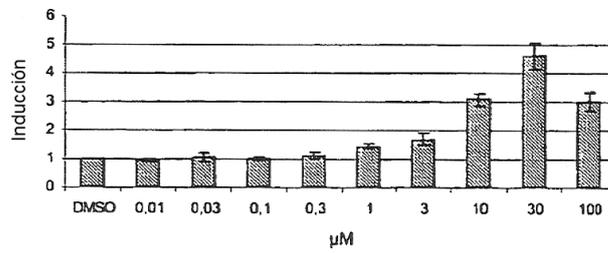


Figura 1-20

hGal4-PPAR delta  
Comp. 7

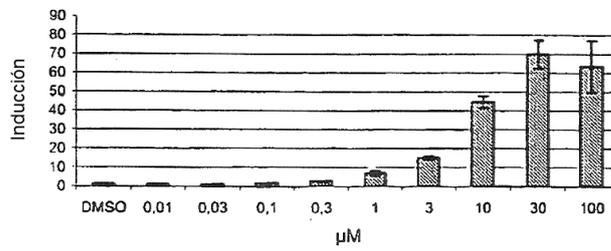


Figura 1-21

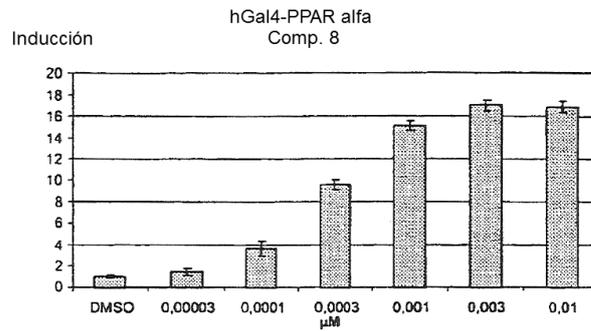


Figura 1-22

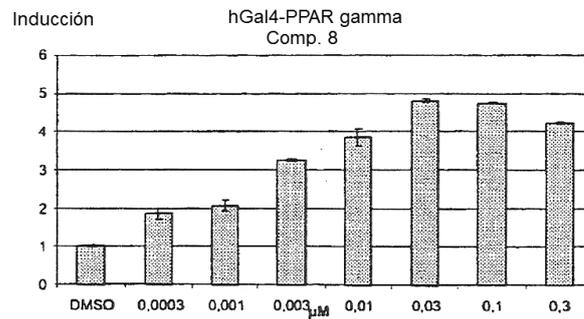


Figura 1-23

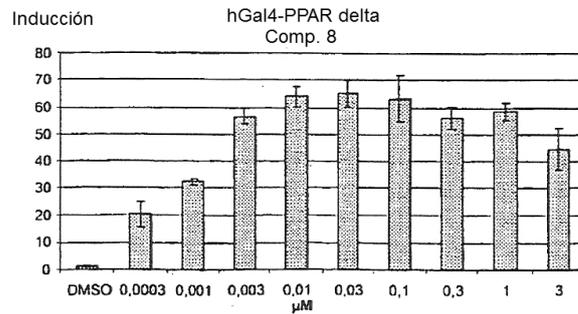


Figura 1-24

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 9

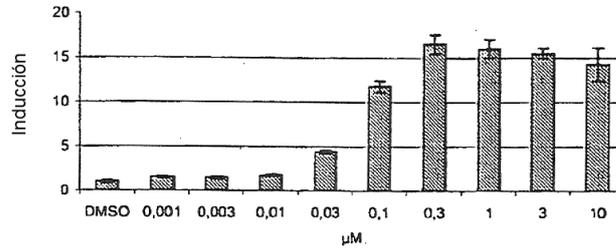


Figura 1-25

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 9

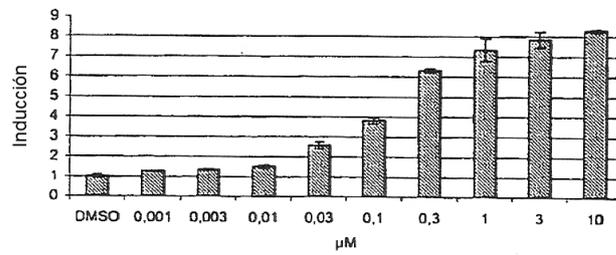


Figura 1-26

hGal4-PPAR delta  
Comp. 9

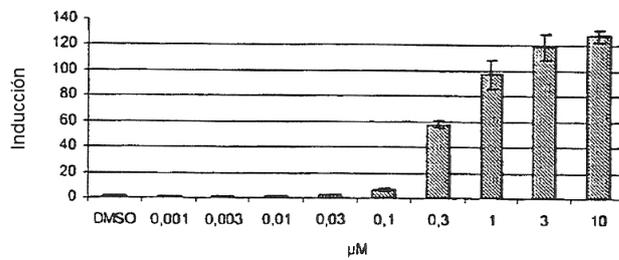


Figura 1-27

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 10

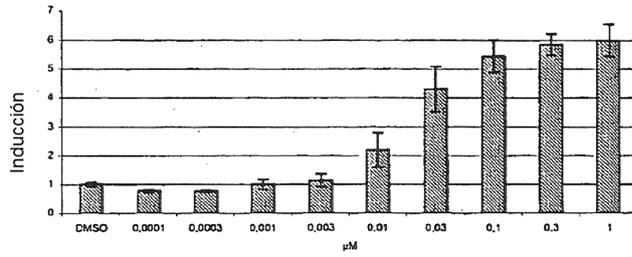


Figura 1-28

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 10

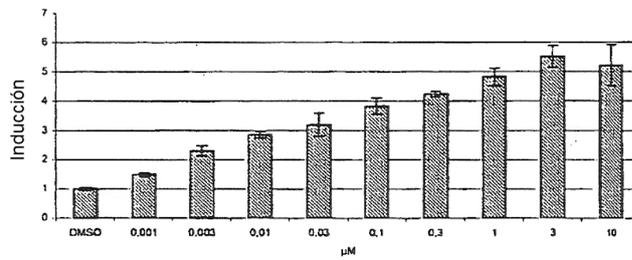


Figura 1-29

hGal4-PPAR delta  
Comp. 10

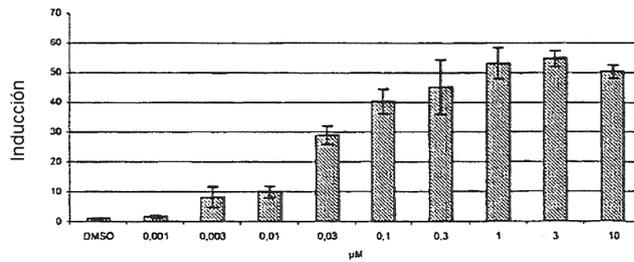


Figura 1-30

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 11

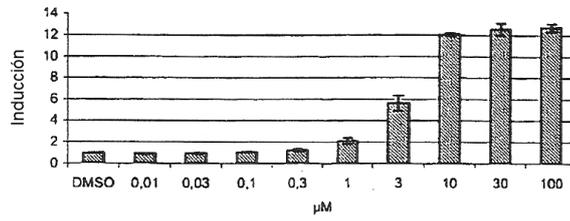


Figura 1-31

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 11

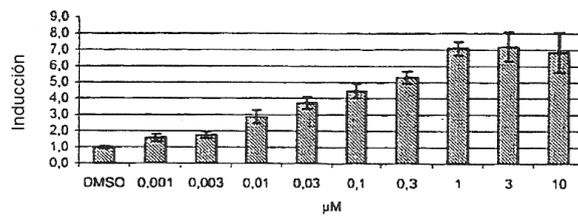


Figura 1-32

hGal4-PPAR delta  
Comp. 11

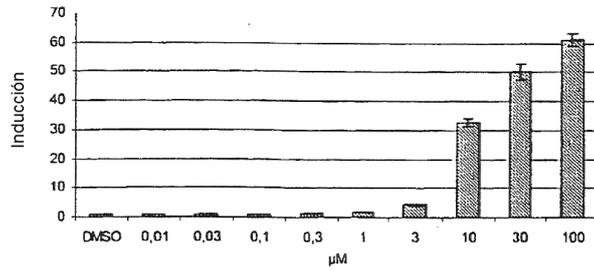


Figura 1-33

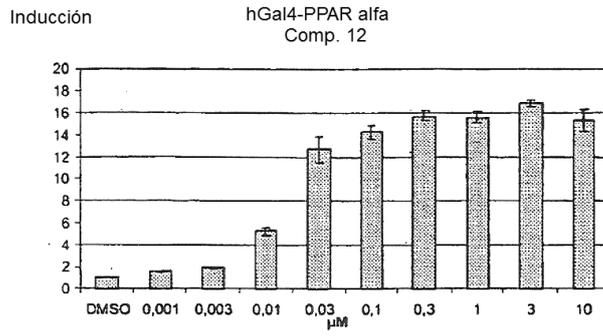


Figura 1-34

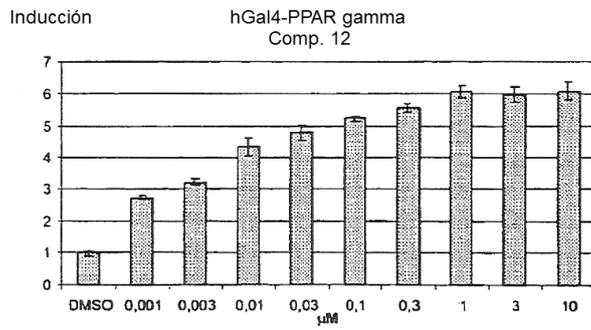


Figura 1-35

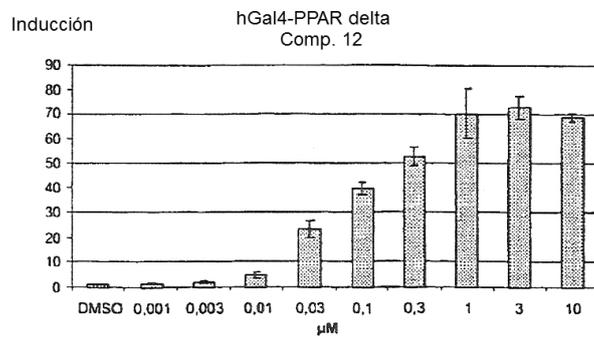


Figura 1-36

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 14

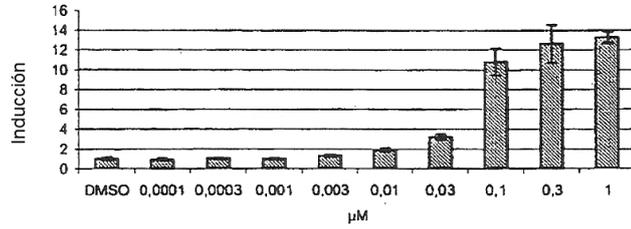


Figura 1-37

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 14

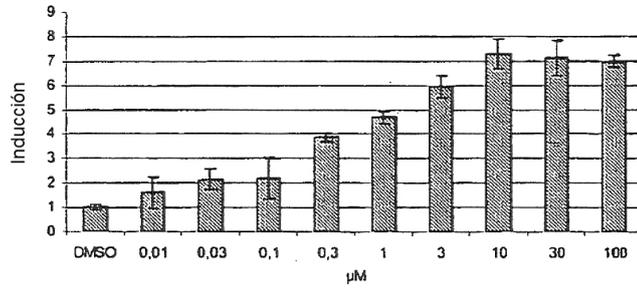


Figura 1-38

hGal4-PPAR delta  
Comp. 14

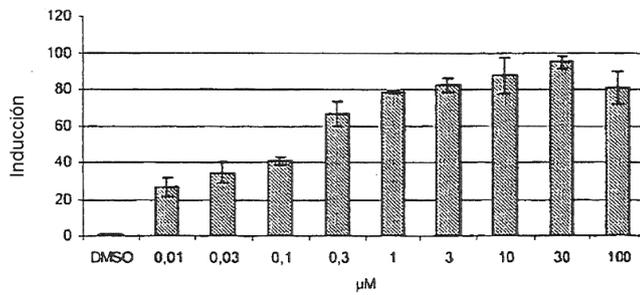


Figura 1-39

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 17

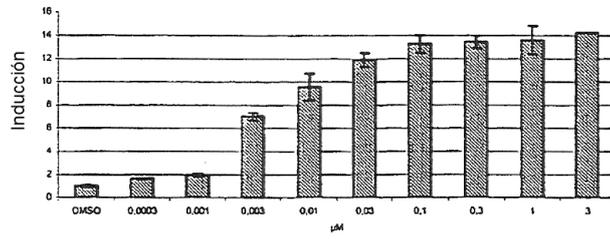


Figura 1-40

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 17

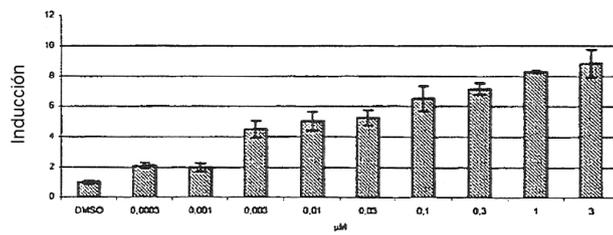


Figura 1-41

hGal4-PPAR delta  
Comp. 17

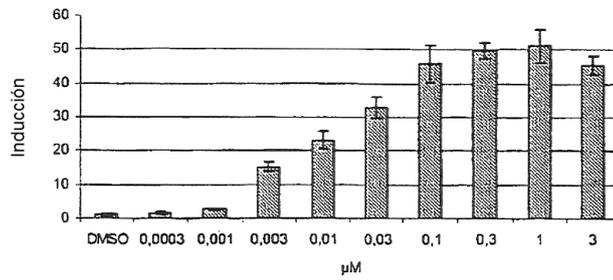


Figura 1-42

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 18

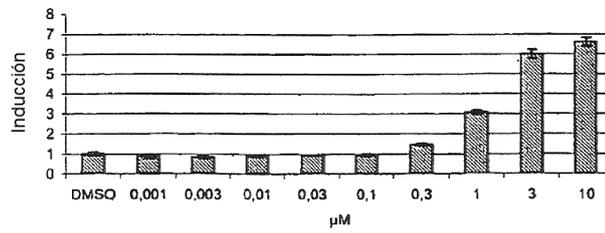


Figura 1-43

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 18

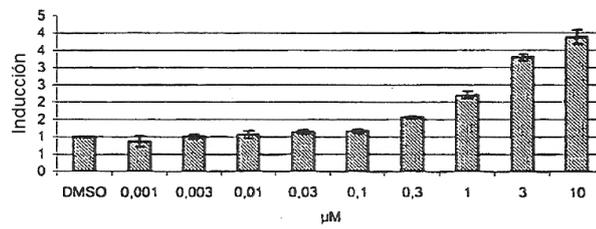


Figura 1-44

hGal4-PPAR delta  
Comp. 18

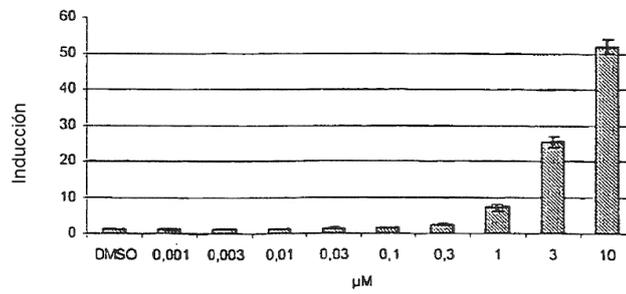


Figura 1-45

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 19

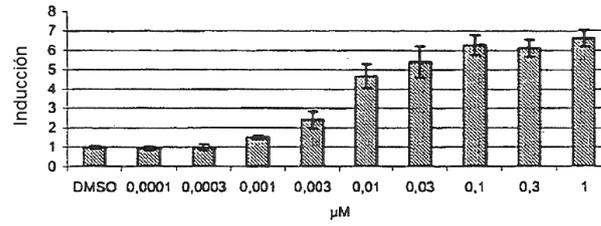


Figura 1-46

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 19

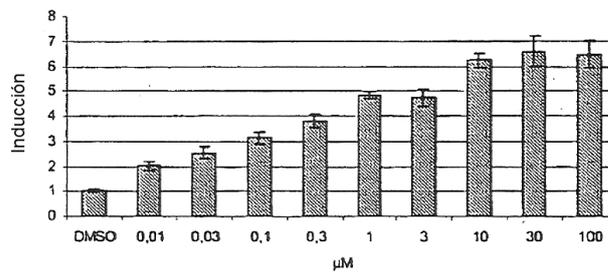


Figura 1-47

hGal4-PPAR delta  
Comp. 19

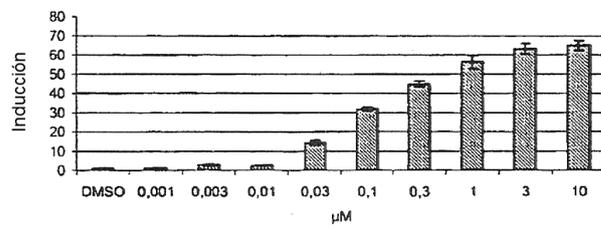


Figura 1-48

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 20

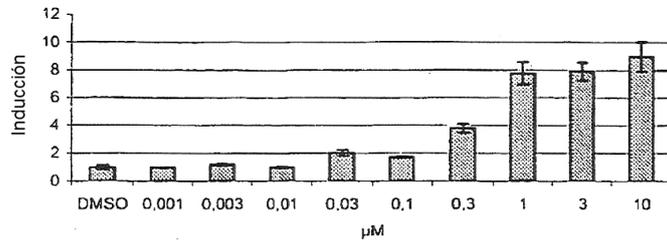


Figura 1-49

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 20

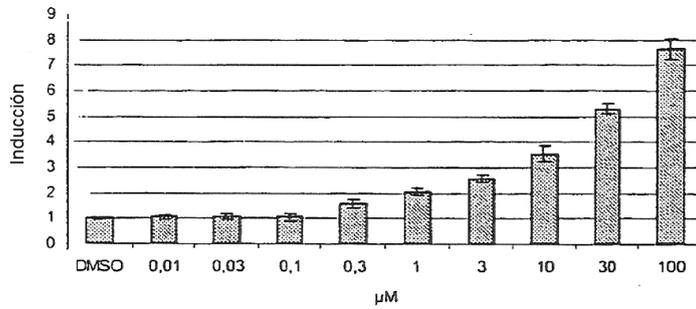


Figura 1-50

hGal4-PPAR delta  
Comp. 20

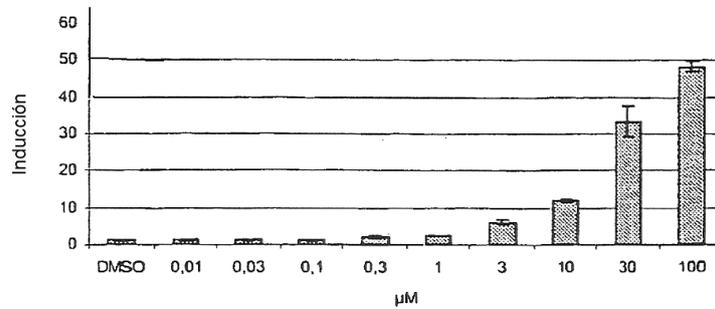


Figura 1-51

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 21

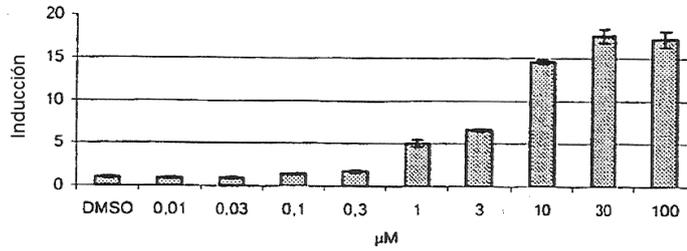


Figura 1-52

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 21

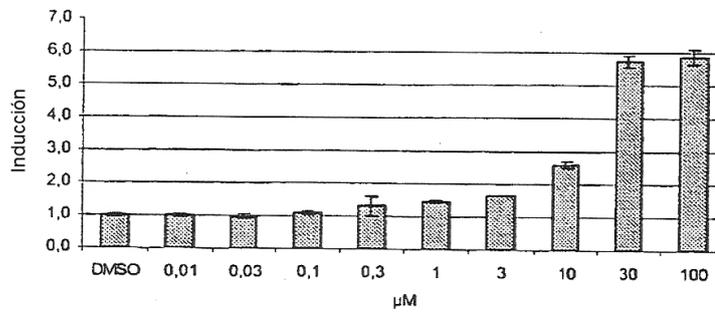


Figura 1-53

hGal4-PPAR delta  
Comp. 21

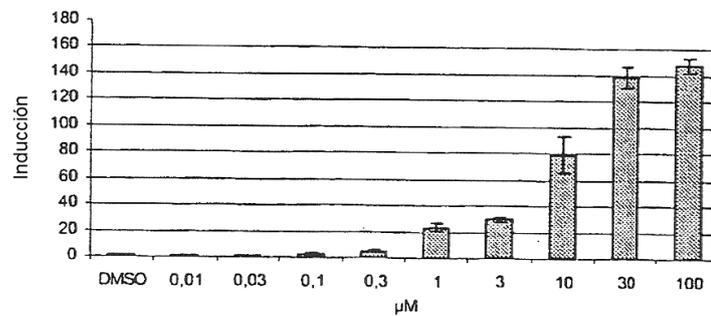


Figura 1-54

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 22

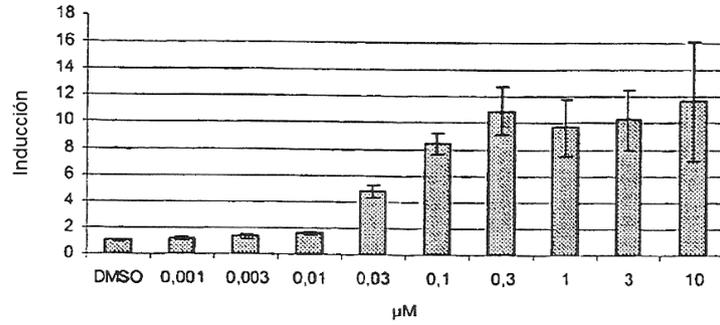


Figura 1-55

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 22

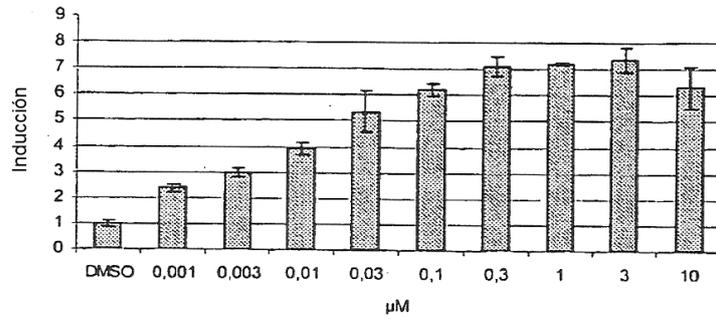


Figura 1-56

hGal4-PPAR delta  
Comp. 22

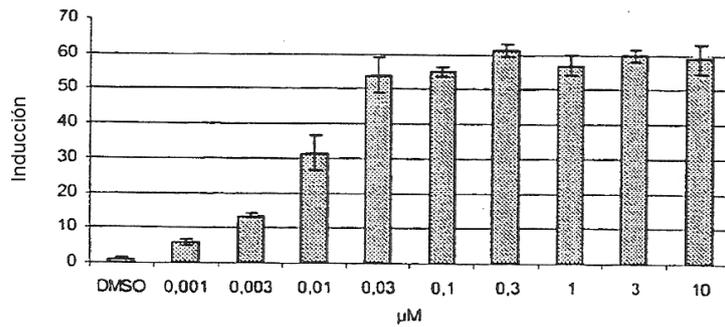


Figura 1-57

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 23

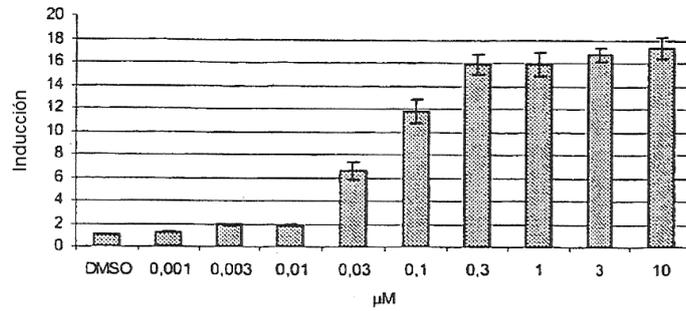


Figura 1-58

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 23

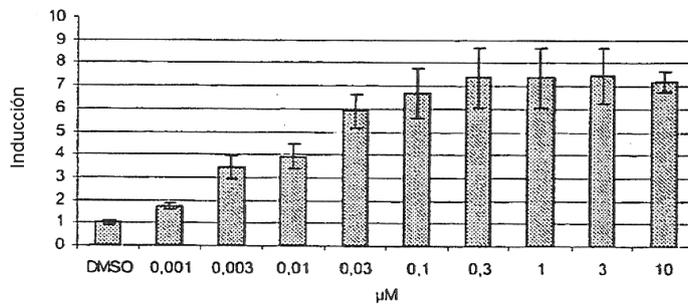


Figura 1-59

hGal4-PPAR delta  
Comp. 23

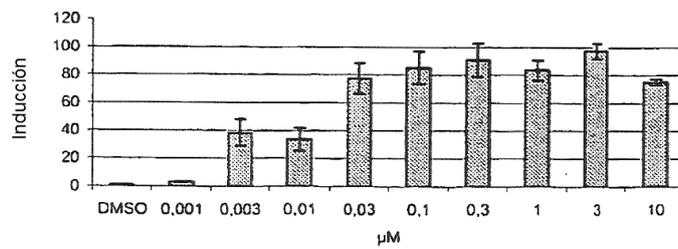


Figura 1-60

hGal4-PPAR alfa  
Comp. 24

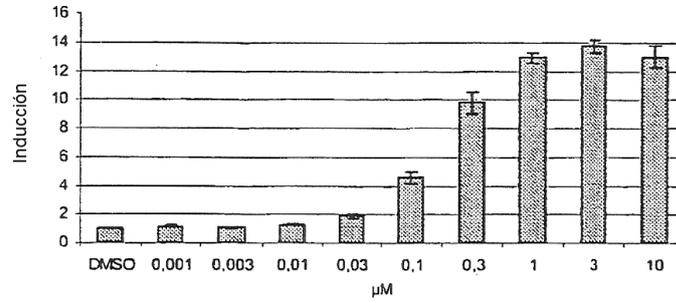


Figura 1-61

hGal4-PPAR gamma  
Comp. 24

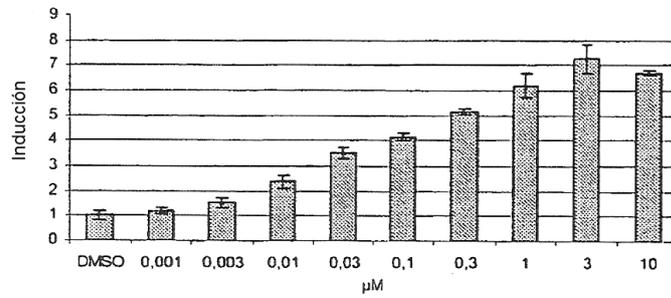


Figura 1-62

hGal4-PPAR delta  
Comp. 24

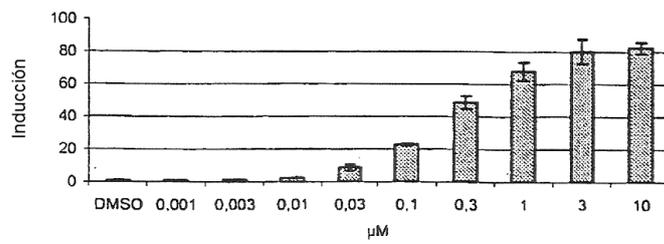


Figura 1-63

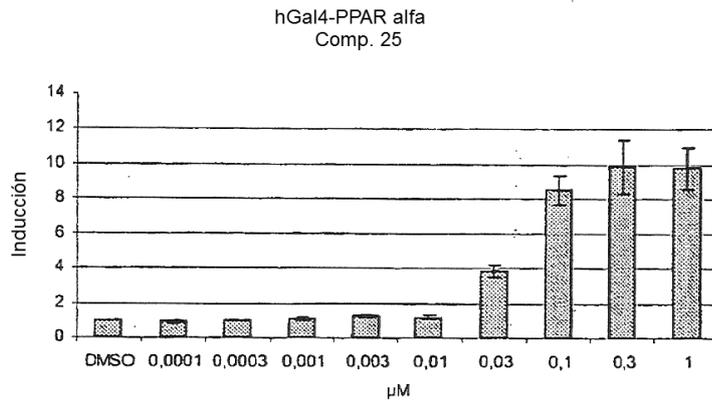


Figura 1-64

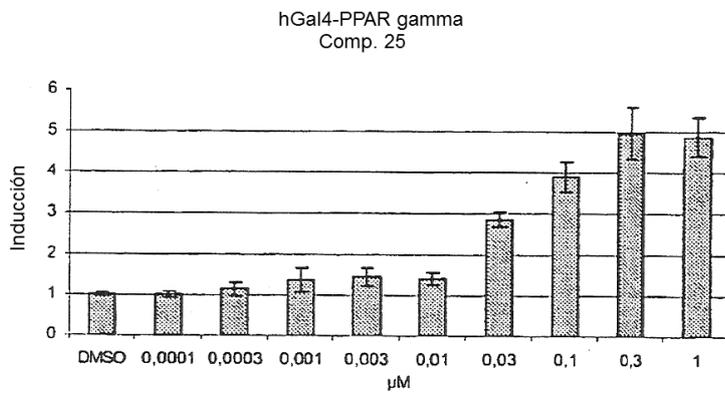


Figura 1-65

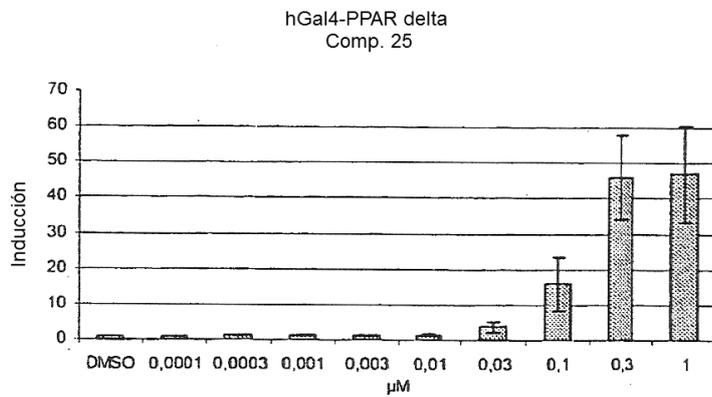


Figura 1-66

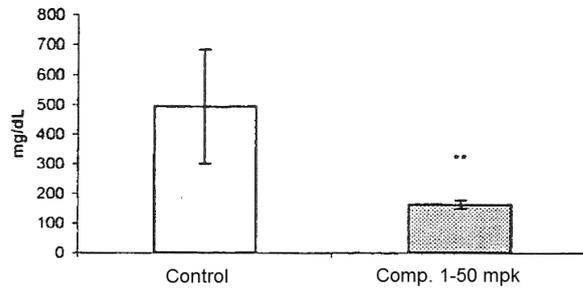


Figura 2-1

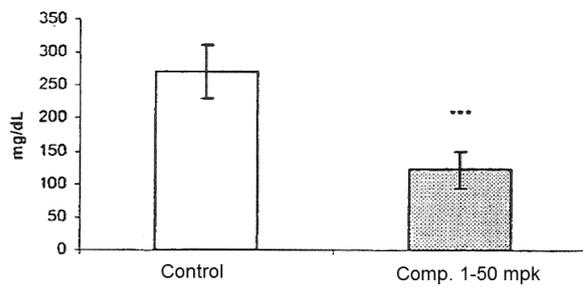


Figura 2-2

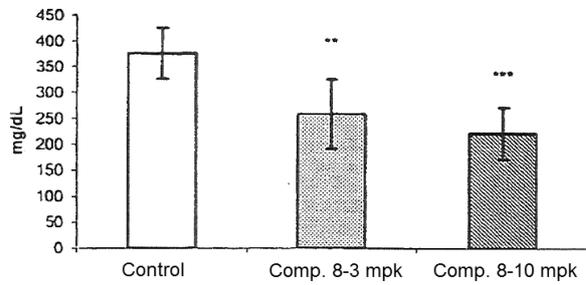


Figura 2-3

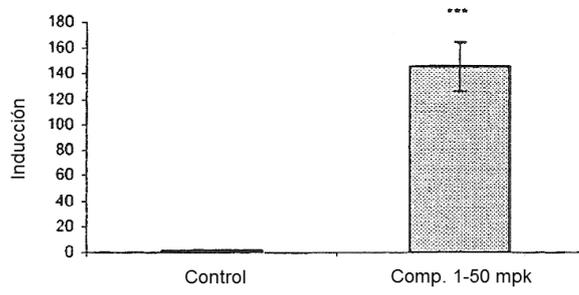


Figura 2-4

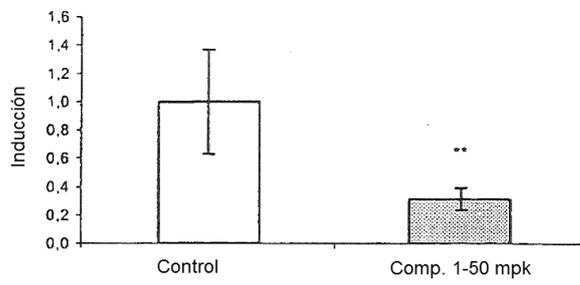


Figura 2-5

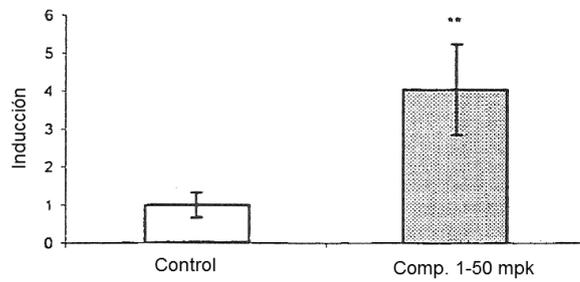


Figura 2-6

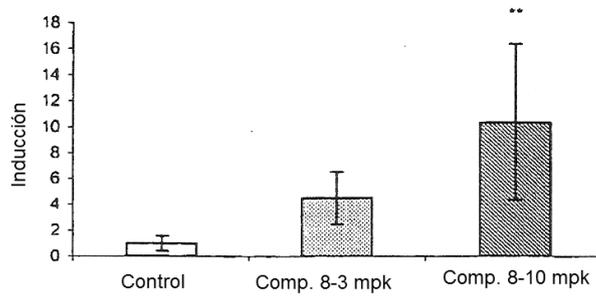


Figura 2-7

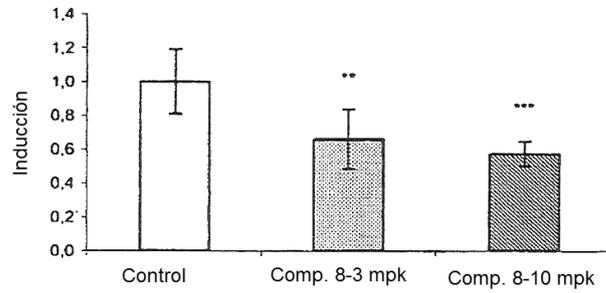


Figura 2-8

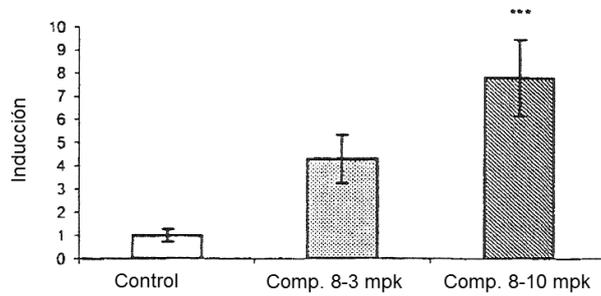


Figura 2-9

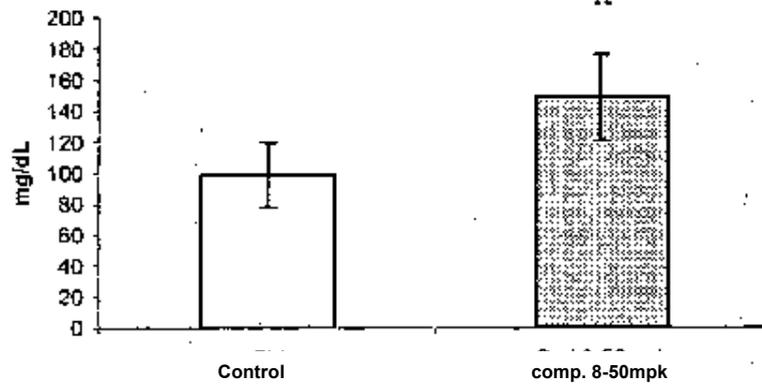


Figura 3-1

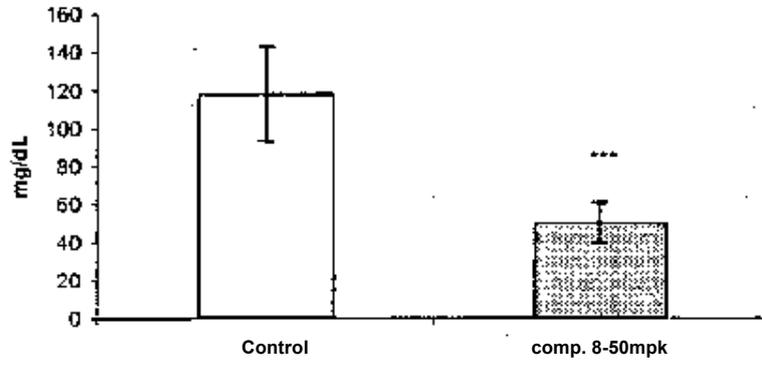


Figura 3-2

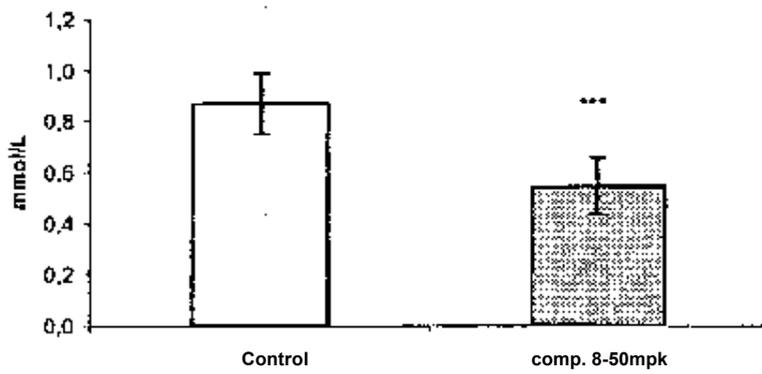


Figura 3-3

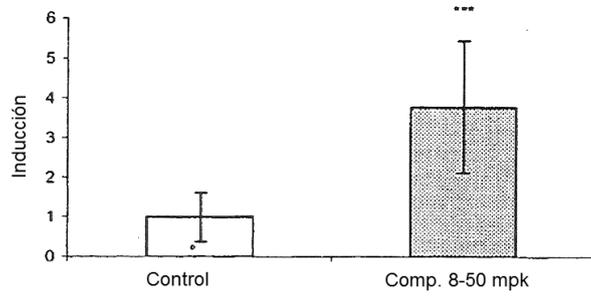


Figura 3-4

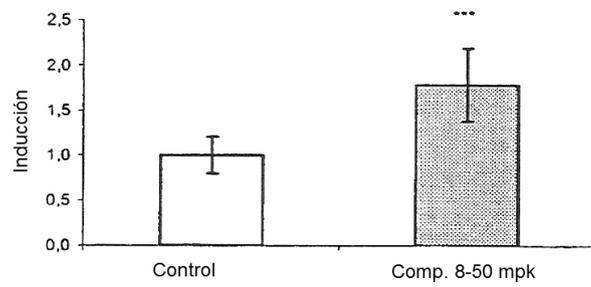


Figura 3-5

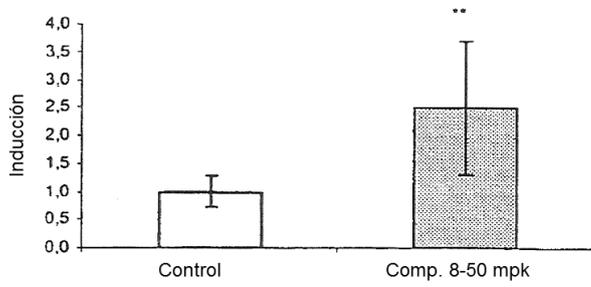


Figura 3-6

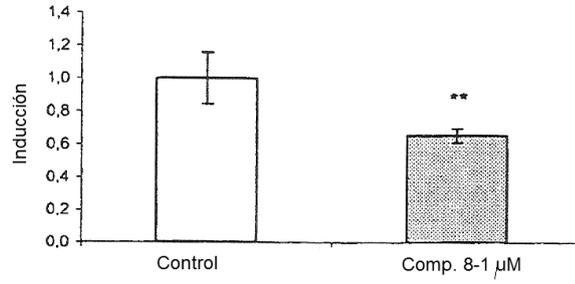


Figura 4-1