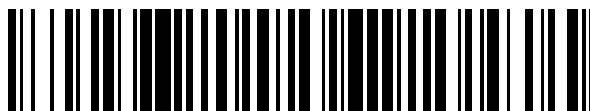


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 568**

51 Int. Cl.:

**C07D 405/06** (2006.01)

**C07D 409/06** (2006.01)

**C07D 413/06** (2006.01)

**C07D 417/06** (2006.01)

**C07D 471/10** (2006.01)

**A61K 31/438** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10784390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2507228**

54 Título: **Compuestos novedosos de espiropiperidina**

30 Prioridad:

**30.11.2009 US 265181 P**

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

**13.01.2015**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**HAMDOUCHI, CHAFIQ;  
LINESWALA, JAYANA PANKAJ y  
MAITI, PRANAB**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 526 568 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos novedosos de espiropiperidina

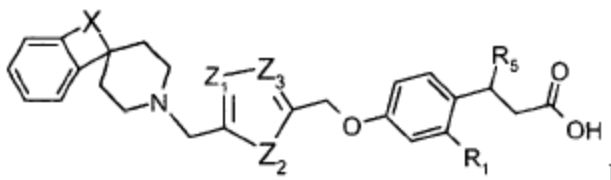
La administración de medicamentos aprobados en la actualidad para el tratamiento de diabetes ha sido asociada con efectos adversos no deseados que a veces incluyen hipoglucemia, daño hepático, enfermedad gastrointestinal, aumento de peso u otros efectos no deseados que pueden estar asociados con la actividad PPAR gamma.

GPR40 es un receptor acoplado a proteína G del cual se ha informado que se expresa predominantemente a altos niveles en células beta pancreáticas de roedor, líneas celulares de insulinoma e islotes humanos. Este receptor es activado por los ácidos grasos de cadena larga y media y, de esta manera, el receptor se conoce también como FFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1, receptor 1 de ácidos grasos libres). La dependencia de glucosa de la secreción de insulina es una característica importante de la activación de GPR40, haciendo que este receptor sea un excelente objetivo para el desarrollo eficaz para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 ("DT2").

Una solicitud de patente US, US 2009/0170908 A1, publicada recientemente, divulga en general compuestos que tienen una característica grupo espiro de hidrocarburos y se afirma que tienen actividad como moduladores de receptor 40 acoplado a proteína G ("GPR40"). Los compuestos de la divulgación de la solicitud US 2009/0170908 A1 son compuestos que requieren un grupo hidrocarburo espiro que está libre de heteroátomos en la característica espiro. En contraste, muchos de los compuestos de espiropiperidina reivindicados en la actualidad proporcionan una activación selectiva deseada de GPR40 sin actividad PPAR detectable.

Los compuestos de la presente invención son potentes activadores de GPR40. La presente invención proporciona una opción de tratamiento novedosa deseada que actúa a través de un mecanismo farmacológico que es único en comparación con los tratamientos disponibles comercialmente y proporciona además compuestos que activan selectivamente GPR40 en comparación con PPAR gamma. El perfil farmacológico de los compuestos de la presente invención, como activadores selectivos de GPR40, puede ser particularmente deseable para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Además, la modulación selectiva de GPR40 puede proporcionar un perfil de seguridad particularmente deseable para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2, evitando efectos asociados con la modulación de PPAR gamma.

La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en la que

$R_1$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H, F y Cl;

$R_5$  es H o  $-C\equiv CCH_3$ ;

X se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH=CH-$ , y  $-N(R_7)CH_2-$ ;

$R_7$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H y alquilo  $C_{1-3}$ ;

$Z_1$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-C(R_3)-$  y  $-N-$ ;

$R_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H,  $OCH_3$  y  $CH_3$ ;

$Z_2$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-S-$  y  $-O-$ ;

$Z_3$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-C(R_4)-$  y  $-N-$ ;

$R_4$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H,  $OCH_3$  y  $CH_3$ ; y

en la que al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en  $Z_1$  y  $Z_3$  es  $-C(R_3)-$  o  $-C(R_4)-$ .

Una realización adicional de la presente invención proporciona el uso de un compuesto según se reivindica por la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la fabricación de un medicamento. Otra

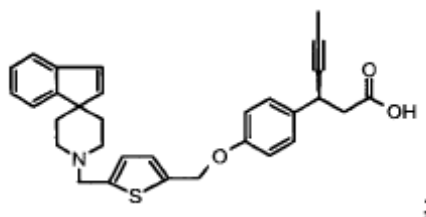
- realización de la invención es una en la que el medicamento es para su uso en el tratamiento de la diabetes. Una realización adicional de la presente invención es el uso de un compuesto según se reivindica en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como una terapia. Una realización adicional de la invención es un compuesto según se reivindica en la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la diabetes. Además, la invención se refiere a un compuesto según se reivindica en la presente invención para su uso como un medicamento.
- Una realización adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de la diabetes en un mamífero, que comprende la etapa de administrar al mamífero un compuesto según se reivindica en la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- En otra realización, la presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según se reivindica en la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una realización adicional es una composición farmacéutica de la presente invención que comprende además un segundo agente farmacéutico.
- En una realización preferente de la invención, los compuestos de la presente invención activan selectivamente GPR40 con respecto a PPAR gamma. Los valores  $IC_{50}$  relativos para la actividad PPAR de los compuestos ejemplificados son generalmente mayores de 10  $\mu$ M, lo que apoya la tesis de que dicho compuesto no activa las isoformas de PPAR.
- Cuando  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ , los compuestos de Fórmula I tienen un centro quiral. La presente invención contempla tanto los compuestos racémicos como las formas isoméricas individuales. Cuando  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ , entonces generalmente es preferente el isómero S.
- Los compuestos de Fórmula I en la que  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$  son preferentes. Además, los compuestos en los que  $R_5$  es H y  $R_1$  es F son preferentes. Los compuestos en los que  $R_1$  es H son preferentes cuando  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ . Los compuestos en los que X se selecciona de entre  $-CH_2CH_2-$  y  $-CH=CH-$  son preferentes. Los compuestos en los que X es  $-CH=CH-$  son preferentes. Los compuestos en los que  $Z_2$  es  $-S-$  son preferentes. Los compuestos en los que  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$  son preferentes. Los compuestos en los que  $Z_3$  es  $-C(R_4)-$  son preferentes. Los compuestos en los que  $R_3$  se selecciona de entre H y  $CH_3$  son preferentes. Los compuestos en los que  $R_4$  es H son preferentes. Los compuestos en los que X es  $-N(CH_3)CH_2-$  son preferentes.
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es H;  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ ;  $-X$  es  $-CH=CH-$ ,  $Z_2$  es  $-S-$ .
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es H;  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ ;  $-X$  es  $-CH=CH-$ ,  $Z_2$  es  $-S-$ ;  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$ ;  $Z_3$  es  $-C(R_4)-$ .
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es H;  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ ;  $-X$  es  $-CH=CH-$ ,  $Z_2$  es  $-S-$ ;  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$ ;  $Z_3$  es  $-CH-$ .
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es F o Cl;  $R_5$  es H; X es  $-CH=CH-$ ;  $Z_2$  es  $-S-$ .
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es F;  $R_5$  es H; X es  $-CH=CH-$ ;  $Z_2$  es  $-S-$ ;  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$ ;  $Z_3$  es  $-C(R_4)-$ .
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es F o Cl cuando  $R_5$  es H;
- Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:
- $R_1$  es H;  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ ;  $Z_2$  es  $-S-$  y X es  $-CH=CH-$  o  $-N(CH_3)CH_2-$ .

Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

$R_1$  es H;  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ ;  $Z_2$  es -S- y X es  $-CH=CH-$  o  $-N(CH_3)CH_2-$ ;  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$ ;  $Z_3$  es  $-CH-$ .

5 Otra realización preferente de la presente invención es el isómero S del compuesto de Fórmula I en la que  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ .

Una realización preferente de la presente invención es un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como una composición farmacéutica administrada por una diversidad de rutas. Más preferentemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., ed. 21, Mack Publishing Co., 2005).

20 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos de la invención consideradas aceptables para su uso clínico y/o veterinario. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHAWiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, Enero de 1977.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo, diluyente, excipientes y la sal son farmacéuticamente compatibles con el resto de ingredientes de la composición.

25 Las abreviaturas usadas en la presente memoria se definen según Aldrichimica Acta, Vol. 17, Nº 1, 1984. Otras abreviaturas se definen de la siguiente manera: "Prep" se refiere a preparación; "Ej" se refiere a ejemplo; "min" se refiere a minuto o minutos; "ADDP" se refiere a 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina; "DCM" se refiere a diclorometano; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; " $T_R$ " se refiere a tiempo de retención; " $IC_{50}$ " se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "DMEM" se refiere al medio de Eagle modificado por Dulbecco; "DTT" se refiere a ditiotreititol; "F12" se refiere al medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "PPAR" se refiere a receptor activado por proliferador del peroxisoma; "PPRE" se refiere a elemento de respuesta de proliferadores de peroxisomas; "RPMI" se refiere a Roswell Park Memorial Institute; "TK" se refiere a timidina quinasa, "RFU" se refiere a unidad de fluorescencia relativa; y "ESI" se refiere a ionización por electropulverización.

30

35 En los esquemas siguientes, a menos que se indique lo contrario, todos los sustituyentes son tal como se ha definido anteriormente. En general, los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para una persona con conocimientos ordinarios en la materia. Otros pueden ser preparados mediante técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica que son análogas a las síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos y los procedimientos descritos en los Esquemas, Preparaciones y Ejemplos siguientes, incluyendo posibles nuevos procedimientos.

40

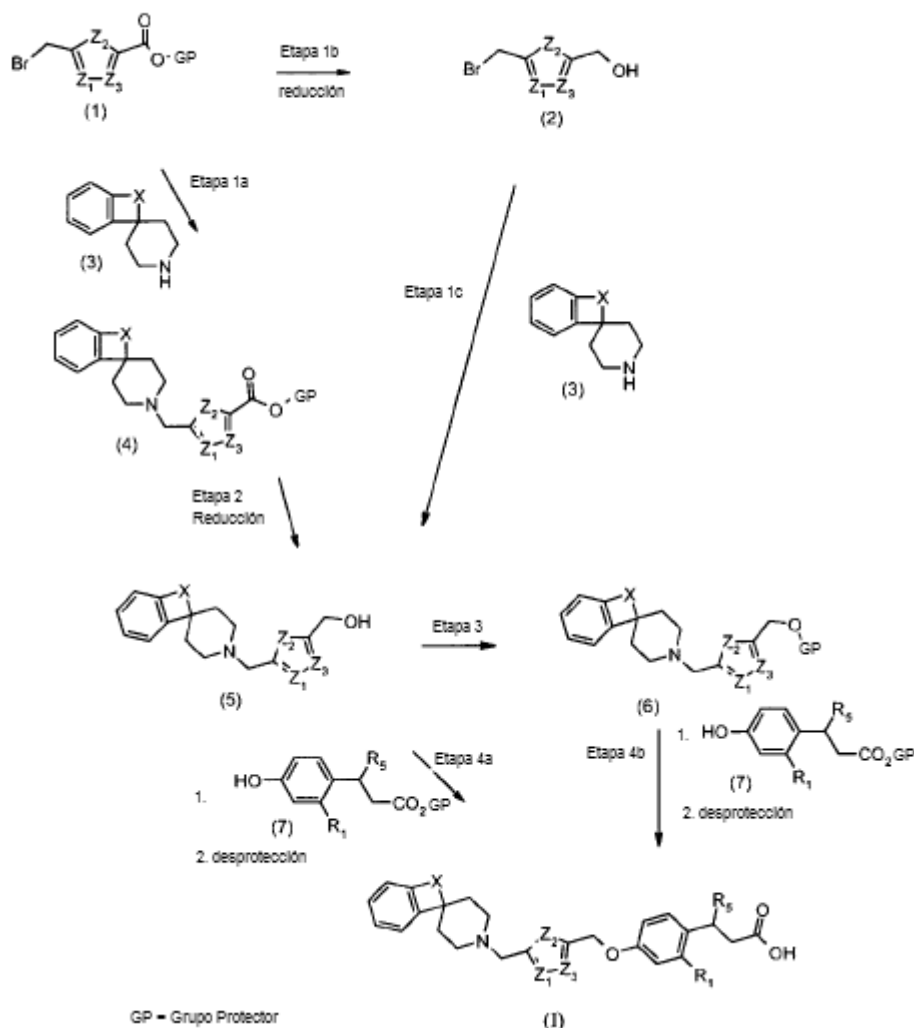
## Esquema I

5

10

15

20



25

30

Un compuesto de Fórmula I puede ser preparado según reacciones como las representadas en el Esquema I. El Esquema I (Etapa 1a) representa la alquilación de un compuesto (1) de bromometilo heterocíclico aromático, sustituido o no sustituido, con una piperidina (3) sustituida apropiada para dar, después de la reducción del éster en la Etapa 2, un alcohol de metilo (5) aromático heterocíclico sustituido. A continuación, el compuesto (5) puede ser ampliado adicionalmente mediante una reacción de Mitsunobu en el hidroxilo o alquilación y desprotección para dar compuestos de Fórmula I. "PG" es un grupo protector desarrollado para un ácido tal como ésteres y también para un grupo amino tal como carbamatos y amidas. Dichos grupos protectores son bien conocidos y apreciados en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, supra.

35

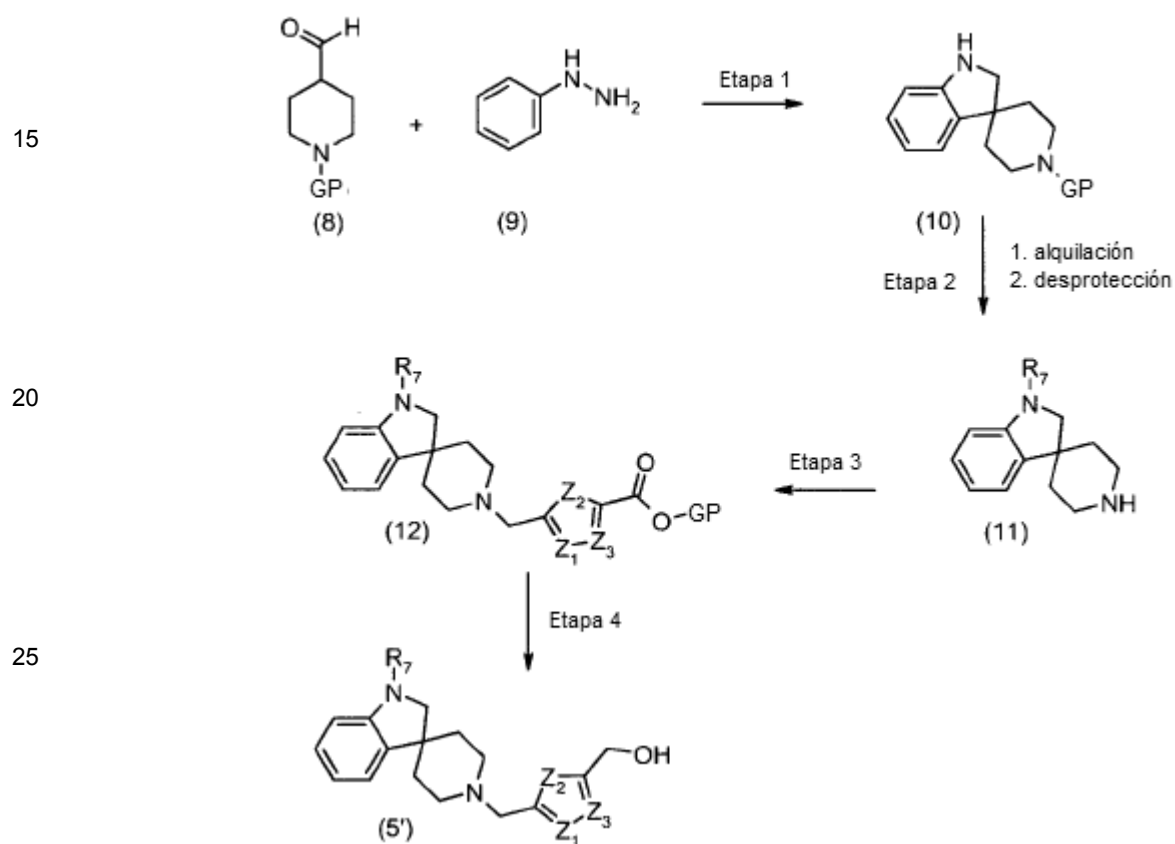
40

Un compuesto de Fórmula (1) se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula (3) en condiciones de alquilación (Etapa 1a). Una persona con conocimientos en la materia reconocerá que hay una serie de procedimientos y reactivos para la alquilación de amina resultante de la reacción de bromuros y aminas heterocíclicas. Por ejemplo, la reacción de un compuesto apropiado de Fórmula (1) con una amina o una sal de amina apropiada, tal como sal de ácido trifluoroacético o sal de HCl de Fórmula (3) en presencia de una base, tal como diisopropiletilamina o carbonato de cesio, dará un compuesto de Fórmula (4). El éster de Fórmula 4 puede ser reducido al alcohol como en la Etapa 2 usando un agente reductor, tal como hidruro de diisobutilaluminio, hidruro de litio y aluminio o borohidruro de sodio, para dar el compuesto (5). A continuación, el compuesto (5) puede ser alquilado adicionalmente con compuestos de Fórmula (7) bajo condiciones de Mitsunobu y desprotegido para dar compuestos de Fórmula (I), (Etapa 4a). Las condiciones de Mitsunobu son bien conocidas en la técnica e implican hacer reaccionar un alcohol (5) con un nucleófilo, tal como un fenol (7), usando una fosfina, tal como tributil fosfina, trifenilfosfina o trietilfosfina y un azodicarbonilo tales como ADDP o un azodicarboxilato tal como dietilazodicarboxilato (DEAD). De manera alternativa, el compuesto 5 puede ser protegido con un grupo protector tal como metilsulfonilo para dar el compuesto (6, Etapa 3). A continuación, el compuesto 6 puede hacerse reaccionar con (7) usando una base tal como carbonato de cesio y, después de la desprotección del ácido, da

compuestos de Fórmula I. En otra variación, un compuesto de Fórmula (1) puede ser reducido a un alcohol de metilo bromometilo heterocíclico (2), tal como se muestra en la Etapa 1b usando un agente reductor tal como hidruro de diisobutil aluminio o el compuesto (2) puede estar disponible comercialmente y puede ser alquilado con una amina o una sal de amina apropiada de Fórmula (3, Etapa 1c) en presencia de una base tal como diisopropiletilamina o carbonato de cesio para dar el compuesto (5) y, a continuación, puede continuarse tal como se ha descrito anteriormente para dar compuestos de Fórmula (I).

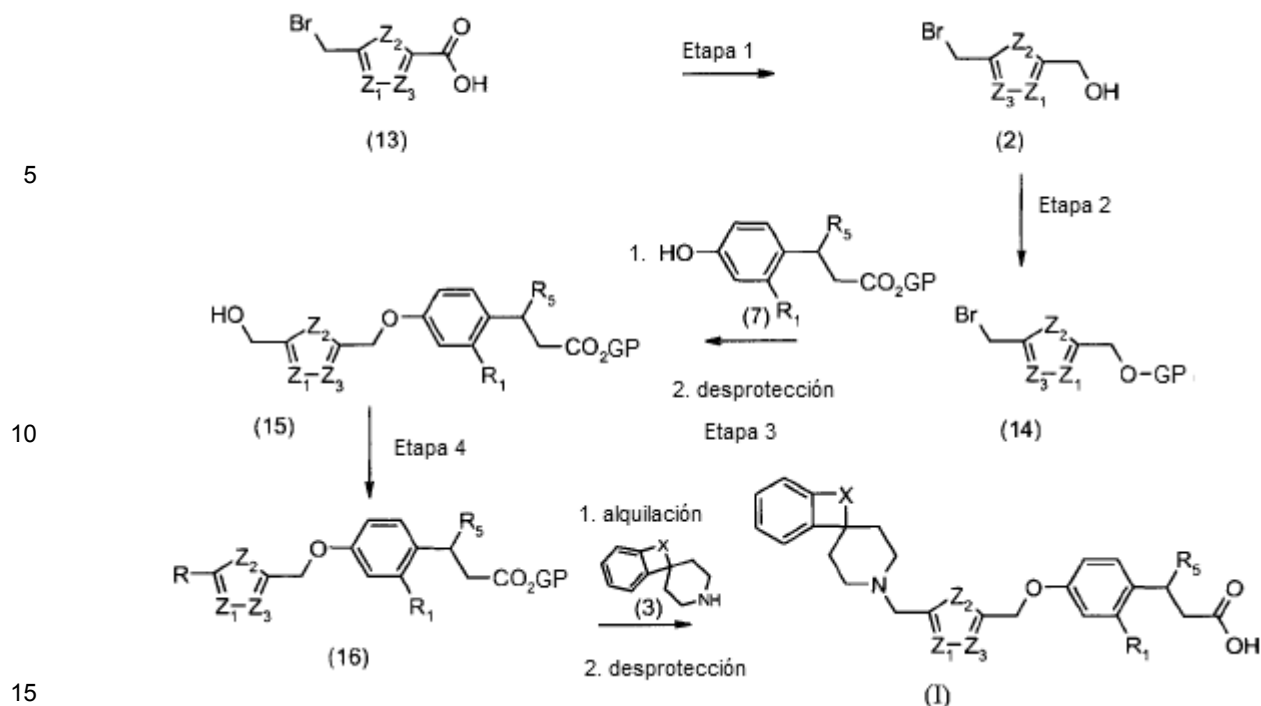
En una etapa opcional, una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) puede ser formada haciendo reaccionar un ácido apropiado de Fórmula (I) con una base farmacéuticamente aceptable apropiada en un disolvente adecuado bajo condiciones estándar. Además, la formación de dichas sales puede ocurrir simultáneamente tras la hidrólisis de un éster. La formación de dichas sales es bien conocida y apreciada en la técnica.

Esquema II



En el Esquema II, Etapa 1, un piperidino-4-carboxaldehído (8) protegido se hace reaccionar con una fenilhidrazina (9) sustituida en una ciclación catalizada por ácido para dar una espiro[indolin-3,4'-piperidina] (10) sustituida que, a continuación, puede ser alquilada para dar compuestos de Fórmula (I). Por ejemplo, a fenilhidrazina (9) y un ácido apropiado, tal como ácido trifluoroacético, se añade una -4-formil-piperidina (8) protegida por nitrógeno. Después de un tiempo de reacción apropiado, se añaden un agente reductor tal como borohidruro de sodio y un alcohol tal como metanol para dar la espiro[indolin-3,4'-piperidina protegida] (10) sustituida deseada. En la Etapa 2, el nitrógeno de indolina de (10) puede ser alquilado, por ejemplo, mediante alquilación reductora usando un aldehído apropiado y un agente reductor apropiado tal como cianoborohidruro de sodio en un ácido apropiado tal como ácido acético y un alcohol tal como metanol. El grupo protector en el nitrógeno de la piperidina puede ser eliminado bajo condiciones estándar bien conocidas en la técnica tales como hidrogenación o condiciones ácidas para dar el compuesto (11). A continuación, el compuesto (11), en la etapa 3, puede ser alquilado con (1) tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema I, Etapa 1a, para dar el compuesto (12) y puede ser reducido en la Etapa 4 tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema I, (Etapas 1a y 2) para dar el compuesto (5'). A continuación, puede continuarse con el compuesto (5') para dar compuestos de Fórmula (I), tal como se ha descrito para el Esquema I sustancialmente el mismo que el compuesto (5).

Esquema III



R = -CH<sub>2</sub>Br, -CHO

20

25

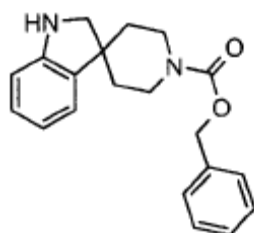
En el Esquema III, un ácido heterocíclico sustituido es reducido bajo condiciones bien conocidas en la técnica usando un agente reductor tal como DIBAL-H para dar el compuesto (2) en la Etapa 1. En la Etapa 2, el alcohol metílico, el compuesto (2) puede ser protegido con un grupo protector tal como tert-butil-dimetil silano usando una base tal como imidazol y tert-butilclorodimetilsilano para dar (14). El compuesto (14) puede ser alquilado con el compuesto (7) usando una base tal como carbonato de potasio y puede ser desprotegido para dar el compuesto (15) en la Etapa 3. El alcohol metílico del compuesto (15) puede ser convertido en un aldehído con un agente oxidante tal como peryodinano de Dess-Martin para dar el compuesto (16) en la Etapa 4 o a un bromuro usando condiciones de bromación tal como tribromuro de fósforo para dar el compuesto (16). A continuación, el compuesto (16) puede ser alquilado con el compuesto (3), Esquema I, bajo condiciones bien conocidas en la técnica tales como alquilación reductiva con cianoborohidruro de sodio, seguida de desprotección, para dar compuestos de Fórmula (I). De manera alternativa, un bromuro puede ser alquilado con el compuesto (3) usando una base tal como carbonato de cesio o N,N-diisopropiletilamina y puede ser desprotegido para dar compuestos de Fórmula (I).

30 **Preparaciones y Ejemplos**

Las preparaciones y los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica de los compuestos de Fórmula (I). Los nombres para los compuestos de la presente invención son proporcionados generalmente por IUPACNAME™, ACDLABS™ o Symyx Draw 3.2.

35 **Preparación 1**

Espiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-carboxilato de bencilo



Una solución de fenil hidrazina (1,29 g, 12,0 mmol) y ácido trifluoroacético (3,0 ml) en una solución 49/1 de tolueno/acetonitrilo (50 ml) se calienta a 35°C. Se disuelve éster bencílico de ácido 4-formil-piperidin-1-carboxílico (2,7 g, 10,91 mmol) en una solución 49/1 de tolueno/acetonitrilo (10 ml) y se añade gota a gota a la mezcla (WO2005046682). La mezcla se agita a 35°C durante la noche. La solución resultante se enfría a 0° C, y se añade metanol (5 ml). Se añade lentamente NaBH<sub>4</sub> (0,619 g, 16,38 mmol) a la solución y la mezcla se agita durante 45 minutos. La mezcla se lava con NH<sub>4</sub>OH acuoso (6%, 25 ml) y salmuera (30 ml), se seca sobre sulfato de sodio, y se evapora hasta la sequedad para dar un sólido amarillo. El sólido bruto se recristaliza en EtOAc para dar un sólido amarillo pálido (1,25 g, 1er cultivo). El licor madre se evapora y se purifica mediante cromatografía flash, eluyendo con hexano:acetato de etilo (8: 2) para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (1,2 g, 2º cultivo) con un rendimiento total (2,4 g, 84%). ESI/MS m/z 323 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 2

1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-carboxilato de bencilo

A una solución a 0°C de 1,2-dihidro-1'H-espiro[indol-3,4'-piperidin]-1'-carboxilato de bencilo (315 g, 977,5 mmol), formaldehído (solución acuosa al 40%, 138 ml, 4,9 mol) y ácido acético (279 ml, 4,9 mol) en metanol (6,0 l), se añade cianoborohidruro de sodio (184 g, 2,9 mol) en porciones durante un período de 2 horas (se observa cierta efervescencia). La mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante 6 horas. El pH de la mezcla se ajusta a aproximadamente 8 con una solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub> y se extrae con EtOAc (3 x 5,0 l). Los extractos combinados se lavan con agua (2 x 2,5 l) y salmuera (2,5 l), se secan sobre sulfato de sodio y se evaporan hasta la sequedad para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (310 g, 98,3%). ESI/MS m/z 337 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 3

1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidina]

A una solución de 1-metilespiro[indolein-3,4'-piperidin]-1'-carboxilato de bencilo (0,85 g, 2,52 mmol) en metanol (50 ml) se añade Pd(OH)<sub>2</sub>/C (10%, 0,15 g) y la mezcla se hidrogena con un globo durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtra a través de tierra diatomeácea, se lava con metanol (50 ml) y se evapora hasta la sequedad para dar el compuesto del título (0,5 g, 98%). ESI/MS m/z 203,4 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 4

Ácido (3S)-3-(4-hidroxifenil)hex-4-enoico



Los enantiómeros de ácido 3-(4-hidroxifenil)-hex-4-enoico se separan mediante cromatografía quiral [columna chiralpak IA (250 mm X 4,6 mm), fase móvil (A) n-hexano, fase móvil (B) alcohol isopropílico con 0,01% TFA; composición (85: 15), velocidad de flujo 1,0 ml/min, detección 225 nm) para dar el compuesto del título (4,2 g, 50,58%) tiempo de retención 7,96. ESI/MS m/z 203 (M+H)<sup>+</sup>. La mezcla de enantiómeros se separa también mediante resolución quiral usando un procedimiento similar al descrito en el documento WO2005086661 para dar el compuesto del título.

### Preparación 5

5-(bromometil)-4-metil-tiofen-2-carboxilato de metilo

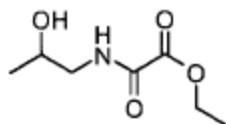




A una solución de 4-metil-tiofen-2-carboxilato de metilo (2,7 g, 6,4 mmol) en diclorometano (20 ml) se añade 48% ac. HBr (12 ml), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 ml), ZnBr<sub>2</sub> (5,4 g), y HCHO (2,2 ml, 37%) a 0-5°C. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución se diluye con agua, se extrae con diclorometano, se lava con una solución NaHCO<sub>3</sub>, solución saturada de salmuera, agua, se seca sobre sulfato de sodio, y se concentra para dar el compuesto del título como un sólido blanco (3,5 g, 81 %).

### Preparación 6

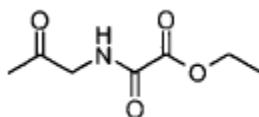
2-(2-hidroxiopropilamino)-2-oxo-acetato de etilo



A una solución agitada de 1-amino-propan-2-ol (15,0 g, 199,7 mmol) en DCM (150,0 ml), se añade trietilamina (43,30 ml, 299,56 mmol) a 0°C. Se añade éster etílico de ácido cloro-oxo-acético (22,35 ml, 199,7 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción a 0°C y la mezcla de reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con agua (100 ml) a 0°C, se extrae con DCM (2 x 100 ml), se lava con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; y se evapora hasta la sequedad. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano:acetato de etilo (3,0: 7,0) para dar el compuesto del título como un gel de color amarillo pálido (10,7 g, 31,0%). ESI/MS m/z 176,2 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 7

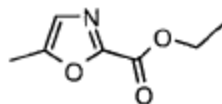
2-(acetoniilamino)-2-oxo-acetato de etilo



A una solución agitada de 2-(2-hidroxiopropilamino)-2-oxo-acetato de etilo (10,7 g, 61,07 mmol) en DCM (100,0 ml), se añade peryodinano de Dess Martin (25,9 g, 61,07 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluye con agua (100 ml) a 0°C, y se extrae con DCM (2 x 100 ml). La capa orgánica combinada se lava con agua (2 x 50 ml) y salmuera saturada (50 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evapora bajo presión reducida. El material bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano:acetato de etilo (1: 1) para dar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (9,2 g, 87,03%). ESI/MS m/z 174,1 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 8

5-metiloxazol-2-carboxilato de etilo



A una solución agitada de 2-(acetoniilamino)-2-oxo-acetato de etilo (9,2 g, 53,12 mmol) en tolueno (100,0 ml), se añade POCl<sub>3</sub> (4,95 ml, 53,12 mmol) y la mezcla de reacción se somete a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfría, se añade en porciones a agua (100,0 ml) y se agita vigorosamente. La capa orgánica se lava con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 ml), agua (2 x 50 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evapora bajo presión reducida. El material bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano:acetato de etilo (8,0:2,0) para dar el compuesto del título (5,1 g, 61,9%) como un aceite amarillo. ESI/MS m/z 156,2 1 (M+H)<sup>+</sup>.

### Preparación 9

5-(bromometil)oxazol-2-carboxilato de etilo

A una solución agitada de 5-metiloxazol-2-carboxilato de etilo (5,1 g, 32,87 y NBS (8,19 g, 46,02 mmol) en tetracloruro de

carbono (50,0 ml), se añade peróxido de benzoilo (0,79 g, 3,29 mmol) y la mezcla de reacción se somete a reflujo durante 16 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se filtra a través de tierra diatomeácea. El filtrado se concentra en vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano:acetato de etilo (9,2:0,8) para dar (4,8 g, 62,33%) del compuesto del título como un aceite de color marrón claro. ESI/MS m/z ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ) 234,1/236,1 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Preparación 10

3-metoxitiofen-2-carboxilato de metilo

A una mezcla de éster metílico de ácido 3-hidroxi-tiofen-2-carboxílico (5 g, 31,6 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22,2 g, 161 mmol) en acetona (50 ml) se añade CH<sub>3</sub>I (10,8 ml, 173 mmol), gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se calienta a 55°C durante 4 horas, se enfría a temperatura ambiente, se filtra a través de tierra diatomeácea, y el filtrado se concentra en vacío. El residuo se diluye con agua (100 ml) y se extrae con acetato de etilo (2 x 200 ml). La capa orgánica combinada se lava con solución de salmuera (50 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; y se evapora en vacío para dar el compuesto del título como un sólido marrón (5,9 g). ESI/MS m/z 173,1 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Preparación 11

5-(bromometil)-3-metoxi-tiofen-2-carboxilato de metilo

A una solución de éster metílico de ácido 3-metoxi-tiofen-2-carboxílico (5 g, 29 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml), se añaden secuencialmente HBr acuoso (22 ml, 37%), 98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (11 ml), ZnBr<sub>2</sub> (8,5 g) y formaldehído acuoso (37%, 3,8 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. La capa orgánica se separa y la capa acuosa se extrae con DCM (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con solución de salmuera (200 ml), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporan en vacío. El material bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano:acetato de etilo (9,5: 0,5) para dar el compuesto del título (4,4 g, 60%). ESI/MS m/z 267,1 (M+H)<sup>+</sup>.

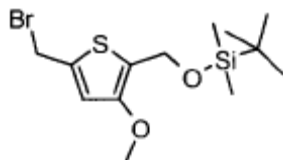
#### Preparación 12

(5-bromometil-3-metoxi-tiofen-2-il)-metanol

A una solución de éster metílico de ácido 5-bromometil-3-metoxi-tiofen-2-carboxílico (1,4 g, 5,2 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) se añade hidruro de diisobutil aluminio (1 M en hexano, 21,0 ml, 21,1 mmol) gota a gota a -78°C. Una vez terminada la adición, la mezcla se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactiva con agua (15 ml) a -40°C y la mezcla se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra a través de tierra diatomeácea. El filtrado se seca sobre sulfato sódico y se concentra, para dar el compuesto del título como un líquido de color amarillo pálido (1,2 g, 96%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, d<sub>6</sub> DMSO) 7,46 (s, 1H), 4,58 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,73 (s, 2H).

#### Preparación 13

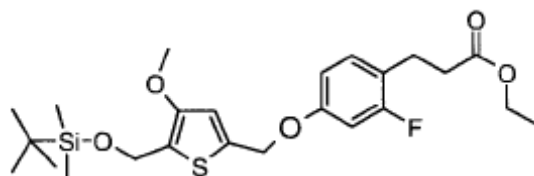
[5-(bromometil)-3-metoxi-2-tienil]metoxi-tert-butil-dimetil-silano



A una solución de (5-bromometil-3-metoxi-tiofen-2-il) metanol (0,6 g, 2,5 mmol) en diclorometano anhidro (10 ml) se añade imidazol (0,516 g, 7,59 mmol) y tert-butilclorodimetilsilano (0,412 g, 2,75 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con agua y se concentra. El residuo se disuelve en DCM, se lava con agua (25 ml) y salmuera (25 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra para dar el compuesto del título (0,9 g). ESI/MS m/z ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ) 351/353,1 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Preparación 14

3-[4-[[5-[(tert-butil(dimetil)silil)oximetil]-4-metoxi-2-tienil]metoxi]-2-fluoro-fenil]propanoato de etilo



- 5 A una solución de éter etílico de ácido 3-(2-fluoro-4-hidroxi-fenil)-propiónico (1,03 g, 4,8 mmol) en acetonitrilo (15 ml) se añade carbonato de potasio (2,31 g, 16,8 mmol) y (5-bromometil-3-metoxi-tiofen-2-ilmetoxi)-ter-butil-dimetil-silano (1,7 g, 4,8 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se somete a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentra, se diluye con agua y se extrae con EtOAc (2 x 30 ml). Los extractos combinados se lavan con agua (15 ml) y salmuera saturada (15 ml), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran. El material bruto se purifica mediante
- 10 cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano:acetato de etilo (9,6:0,4) para dar el compuesto del título (0,5 g, 21%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 7,51 (s, 1H), 7,26-7,2 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 6,92-6,89 (d, J = 12 Hz, 1H), 6,83 -6,81 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 4,92 (s, 2H), 4,82 (s, 2H), 4,10-4,05 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,86-2,82 (t, J = 16 Hz, 2H), 2,61-2,55 (m, 2H), 1,21-1,17 (t, J = 6,8 Hz, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,13 (s, 6H).

#### Preparación 15

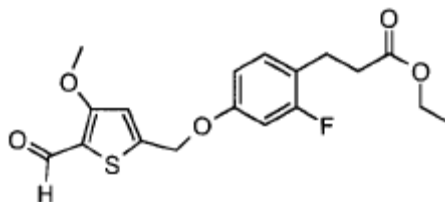
- 15 3-[2-fluoro-4-[[5-(hidroximetil)-4-metoxi-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo

A una solución de éster etílico de ácido 3-{4-[5-(tert-butil-dimetil-silaniloximetil)-4-metoxi-tiofen-2-ilmetoxi]-2-fluoro-fenil}-propiónico (0,5 g, 1,0 mmol) en THF (5 ml) se añade fluoruro de tetra-n-butil amonio (solución 1 M en THF, 2 ml, 2,0 mmol) a 0°C y la mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a 25°C. La mezcla de reacción se inactiva con agua y se evapora para formar un residuo. El residuo se extrae con EtOAc, se lava con agua (15 ml) y salmuera (15 ml), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra para dar el compuesto del título (0,4 g). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 7,41 (s, 1H), 7,19-7,15 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 6,85-6,75 (m, 2H), 5,32 (br, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,55 (s, 2H), 4,04-4,00 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,58 (s, 1H) 3,16-3,12 (t, J = 15,2 Hz, 3H), 2,79-2,76 (t, J = 14,8 Hz, 2H), 2,55-2,51 (t, J = 15,2 Hz, 2H), 1,28-1,22 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

20

#### Preparación 16

- 25 3-[2-fluoro-4-[[5-formil-4-metoxi-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo



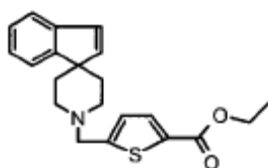
- 30 A una solución de 3-[2-fluoro-4-[[5-(hidroximetil)-4-metoxi-2-tienil] metoxi]fenil]propanoato de etilo (1,6 g, 4,3 mmol) en diclorometano anhidro (10 ml), se enfría a 0°C, se añade peryodinato de Dess-Martin (2,76 g, 6,5 mmol). La mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua (15 ml), se extrae con acetato de etilo, se lava con agua (15 ml), salmuera (15 ml), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora hasta la sequedad. El material en bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano:acetato de etilo (8,8:1,2) para dar el compuesto del título (0,8 g, 50%). ESI/MS m/z 367,1 (M+H)<sup>+</sup>.
- 35

#### Preparación 17

5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiofen-2-carboxilato de etilo

Procedimiento A

- 40



5 A una solución de espiro[inden-1,4'-piperidina] (1,4 g, 6,3 mmol) en etanol (28 ml) se añade 5-(bromometil)tiófen-2-carboxilato de metilo (1,78 g, 7,6 mmol) y diisopropilamina (3,31 ml, 19 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agita durante 16 horas a 90°C. La mezcla se concentra, se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo (2 x 200 ml). Los extractos combinados se lavan con agua (50 ml) y salmuera saturada (50 ml), se secan sobre sulfato sódico, se filtran y se concentran para dar el compuesto del título (1,5 g, 58%). ESI/MS m/z 340,1 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Procedimiento B

10 Se disuelve clorhidrato de espiro[inden-1,4'-piperidina] (128,0 g, 560 mmol) en etanol (1,5 l) bajo una atmósfera de nitrógeno a 30°C. Se añade diisopropilamina (407,4 ml, 1,68 mol) gota a gota a 30°C durante un período de 10 minutos, y se agita durante 20 minutos. Se añade 5-(bromometil)tiófen-2-carboxilato de etilo (~ 50% pura determinada mediante LCMS) (300 g, 1,27 mol) a 30°C y se agita a 30°C durante 10 minutos y la mezcla se calienta a 60°C durante 1 h 45 min. La reacción supervisada mediante TLC muestra la presencia de material de partida. La reacción es agitada durante 13 horas a 30°C. La mezcla de reacción se concentra y se disuelve en DCM (10 l). Se añade HCl (1 N, 1,5 l) gota a gota con agitación constante y se precipita y se recoge un sólido blanco. El material se disuelve en DCM (1 l), se agita durante 10 minutos, se filtra y se seca bajo vacío (44°C) para dar el compuesto del título (150,0 g, 76%). ESI/MS m/z 340,1 (M+H)<sup>+</sup>.

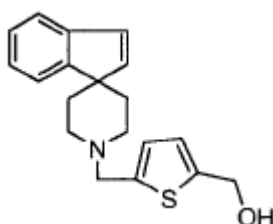
Los compuestos siguientes se preparan esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de la preparación 17 (Procedimiento A).

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
18	5-(1'H-espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-1,3-oxazol-2-carboxilato de etilo	500
19	2-bromo-4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol	a
20	2-[(1-metilspiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]tiazol-5-carboxilato de etilo	372
21	5-[(1-metilspiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]tiófen-2-carboxilato de etilo	357
22	4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiófen-2-carboxilato de metilo	b
23	5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiófen-2-carboxilato de metilo	342
24	5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)furan-2-carboxilato de metilo	324
25	5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-metil-tiazol-2-carboxilato de etilo	355
26	5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-carboxilato de etilo	341
27	5-[(1-metilspiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]furan-2-carboxilato de metilo	341
a. Producto en bruto		
b. <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 7,53 (s, 0,5H), 7,21-7,12 (m, 2H), 3,76 (s, 1,5H), 3,65 (s, 1H), 2,84-2,82 (d, J = 8 Hz, 2H), 2,26-2,21 (t, J = 8 Hz, 1H), 2,16 (s, 1,5H), 1,96-1,92 (d, J = 8 Hz, 1H), 1,79 (s, 1H), 1,45-1,42 (m, 1H).		

#### Preparación 28

20 [5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metanol

#### Procedimiento A



25

5 A una solución de 5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiofen-2-carboxilato de etilo (1,5 g, 4,4 mmol) en diclorometano (30 ml) se añade DIBAL-H (11 ml, 11,06 mmol) a -78°C. La mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de la adición gota a gota de agua a 0°C. La mezcla se filtra a través de tierra diatomeácea, se extrae con diclorometano, y se evapora hasta la sequedad para dar el compuesto del título (1,05 g, 76%). ESI/CMS m/z 312,1 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Procedimiento B

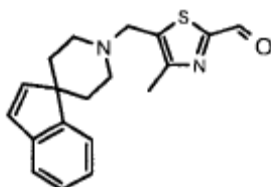
10 Se disuelve 5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil) tiofen-2-carboxilato de metilo (150,0 g, 446,0 mmol) en diclorometano anhidro (3 l) bajo una atmósfera de nitrógeno a 30°C. La mezcla se enfría a -78°C y DIBAL-H (solución 1,0 M en tolueno) (1,2 l, 960 mmol) gota a gota a -78°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante un período de 1 hora con agitación constante. La mezcla de reacción se calienta gradualmente a 0°C y se agita durante 3 horas a 0°C y 3 horas a 30°C. La mezcla se enfría a -78°C y se añade gota a gota una solución de NH<sub>4</sub>OH acuoso saturado (1 l) seguido de la adición gota a gota de DCM (5,0 l). La mezcla se calienta a temperatura ambiente y se extrae con DCM, se lava con agua (2 l) y salmuera saturada (2 l), se seca sobre sulfato de sodio, y se evapora hasta la sequedad. Al residuo se añade éter dietílico (500 ml) y la mezcla se agita durante 30 minutos. El precipitado que se forma se filtra, el filtrado se evapora hasta la sequedad y se combina con el sólido para dar el compuesto del título como un sólido blanco (88,0 g, 64%). ESI/MS m/z 312,1 (M+H)<sup>+</sup>.

Los compuestos siguientes se preparan esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 28 (Procedimiento A)

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS(m/z) (M+H)
29	[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-furil]metanol	313
30	[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metanol	299
31	[2-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metanol	313
32	[2-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metanol	315
33	[2-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]tiazol-5-il]metanol	330
34	[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metanol	329
35	[4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metanol	328
36	[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metanol	314
37	[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-furil]metanol	296
38	[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metanol	297

#### 20 Preparación 39

4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-carbaldehído



25

30 A una solución de 2-bromo-4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol (3,8 g, 10,12 mmol) en THF se añade n-BuLi (0,713 g, 11,13 mmol) a -78°C. La mezcla se calienta a -45°C y se agita durante 30 minutos. Se añade gota a gota DMF (1,5 ml) a la mezcla a -78°C y la mezcla se calienta lentamente a temperatura ambiente y se agita durante una hora. La mezcla se enfría a -78°C, se diluye con agua, seguido de solución de NH<sub>4</sub>Cl. La mezcla se extrae con acetato de etilo, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evapora hasta la sequedad para dar el compuesto del título (2,8 g, 85%). ESI/MS m/z 325 (M+H)<sup>+</sup>.

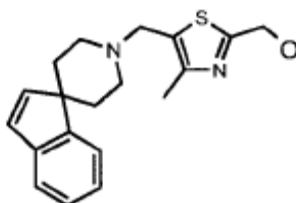
El compuesto siguiente se prepara esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 39

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
40	5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-carbaldehído	311

#### Preparación 41

5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-4-metil-tiazol-2-metanol

5



10 A una solución de 4-metil-5-(espiro [inden-1,4'-piperidina] -1'-ilmetil)tiazol-2-carbaldehído (0,600 g, 1,8 mmol) en DCM (6 ml) se añade DIBAL-H (solución 1 M en hexano, 0,52 g, 3,6 ml, 3,6 mmol) a  $-78^{\circ}\text{C}$  y la mezcla se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 1 hora. La mezcla se enfría a  $-78^{\circ}\text{C}$ , se inactiva con agua, se filtra, se extrae con DCM y se evapora hasta la sequedad para dar el compuesto del título (0,500 g, 83%). ESI/MS m/z 327 (M+H)<sup>+</sup>.

El compuesto siguiente se prepara esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 41

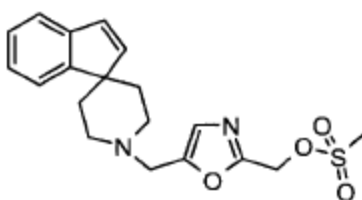
Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
42	5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metanol	313

15

#### Preparación 43

Metanosulfato de [5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metilo

20



25 A una solución agitada a  $0^{\circ}\text{C}$  de [5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metanol (0,15 g, 0,51 mmol) en DCM (10,0 ml) se añade trietilamina (0,18 ml, 1,26 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (0,05 ml, 0,61 mmol). La mezcla de reacción se agita a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. La mezcla de reacción se lava con agua (20,0 ml) y salmuera (10,0 ml), se extrae con DCM, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se evapora hasta la sequedad para dar el producto bruto (0,18 g) como un líquido marrón.

El compuesto siguiente se prepara esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 43

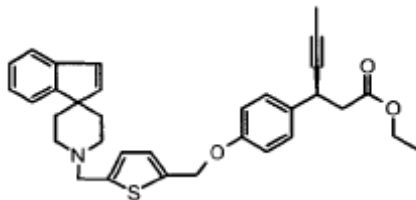
Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
44	Metanosulfonato de [5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metilo	377

#### 30 Preparación 45

(3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato

Procedimiento A

5



10

15

A una solución de 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina (1,30 g, 5,1 mmol) en THF (5 ml) se añade tributilfosfina (1,21 g, 6,0 mmol) a 0°C. Después de 15 minutos a 0°C, se añade una solución de [5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metanol (0,8 g, 3,4 mmol) en THF (5 ml) y la mezcla de reacción se agita durante 15 minutos a 0°C seguido por la adición de (3S)-3-(4-hidroxifenil) hex-4-enoato de etilo (1,07 g, 3,4 mmol) en THF (5 ml). La mezcla de reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente, se filtra, se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo (2 x 200 ml). Los extractos combinados se lavan con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano:acetato de etilo (8,5:1,5) para dar el compuesto del título (1,1g, 61%). ESI/MS m/z 526,2 (M+H)<sup>+</sup>.

Procedimiento B

20

25

El (3S)-3-(4-hidroxifenil)hex-4-enoato de etilo (30,0 g, 129,0 mmol) se disuelve en THF (600 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno y se enfría 0°C. Se añade lentamente DIAD (31,3 g, 154,9 mol) a 0°C y se agita la mezcla agitada durante 30 minutos. Una solución de PPh<sub>3</sub> (40,65 g, 154,9 mmol) y (5-[5-(espiro [inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metanol (48,26 g, 154,9 mmol), disuelta en una cantidad mínima de THF, se añade a la mezcla de reacción a 0°C y la mezcla se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 12 horas. El disolvente se evapora y el residuo se disuelve en acetato de etilo (300 ml), se lava con agua (2 x 10 volúmenes) y salmuera (10 volúmenes), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evapora hasta la sequedad. El material bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano:acetato de etilo (9,0:1,0) para dar el compuesto del título (33,0 g, 48,6%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,44-7,42 (d, 1H), 7,32-7,27 (m, 2H), 7,22-7,12 (m, 2H), 7,03-7,02 (d, 1 H), 6,97-6,92 (m, 3H), 6,89-6,88 (d, 1H), 6,79-6,77 (d, 1H), 6,69-6,67 (d, 1H), 5,21 (s, 2H), 4,02-4,01 (m, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,94-2,91 (d, 2H), 2,68-2,62 (m, 3H), 2,41-2,36 (m, 2H), 2,10-2,03 (m, 2H), 1,77 (s, 3H), 1,39 (s, 1H), 1,27-1,14 (m, 4H), 1,13-1,11 (t, 3H).

Los compuestos siguientes se preparan esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 45 (Procedimiento A)

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
46	(3S)-3-[4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-furil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	527
47	3-[2-fluoro-4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-furil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	490
48	(3S)-3-[4-[[2-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	529
49	(3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	541
50	3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo	521
51	(3S)-3-[4-[[2-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	544
52	(3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	527

30

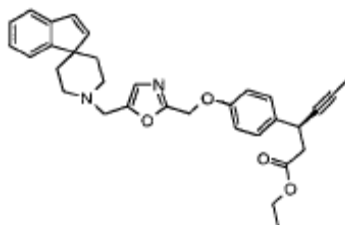
(Cont.)

53	(3S)-3-[4-[[2-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	527
54	(3S)-3-[4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	543
55	3-[2-fluoro-4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	523
56	(3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	540
57	(3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	542
58	3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	522
59	3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	520
60	3-[2-fluoro-4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	a
61	(3S)-3-[4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	528
62	(3S)-3-[4-[[4-metil-2-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	541
63	(3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-furil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	510
64	3-[4-[[5-[[[(1Z,2Z)-2-alliliden-1-etiliden-8-azaspiro[4.5]dec-3-en-8-il]metil]-2-tienil]metoxi]-2-fluoro-fenil]propanoato de etilo	b
<p>a. <math>^1\text{H-RMN}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>): <math>\delta</math> 7,18-7,14 (m, 4H), 7,12-7,08 (m, 1H), 6,94-6,93 (d, J = 4 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,70-6,66 (m, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,14-4,09 (q, J = 4 Hz, 2H), 3,74 (s, 2H), 2,92-2,86 (m, 6H), 2,60-2,56 (m, 2H), 2,24-2,04 (m, 2H), 2,01-1,90 (m, 5H), 1,28-1,23 (m, 6H).</p> <p>b. Producto en bruto</p>		

**Preparación 65**

(3S)-3-[4-[[5-(espiro[indene-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo

5



10 A una solución agitada de metanosulfonato de [5-(1'-H-espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-1,3-oxazol-2-il]metilo (0,18 g, 0,48 mmol) en acetonitrilo (10,0 ml) se añade  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0,39 g, 1,2 mmol) y (3S)-3-(4-hidroxifenil)hex-4-enoato de etilo (0,13 g, 0,57 mmol). La mezcla de reacción se agita a  $80^\circ\text{C}$  durante 1 hora y se filtra a través de tierra diatomeácea. El filtrado se evapora hasta la sequedad y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano:acetato de etilo (6,0:4,0) para dar el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (0,07 g, 28,2%). ESI/MS  $m/z$  511,5 (M+1).

15



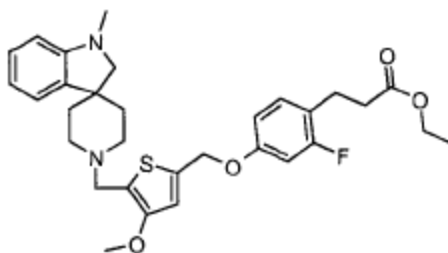
El compuesto siguiente se prepara esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 65

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
66	(3S)-3-[4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo	513

### Preparación 67

3-[2-fluoro-4-[[4-metoxi-5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo

5



10

A una solución a 0°C de 3-[2-fluoro-4-[[5-formil-4-metoxi-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,4 g, 1,0 mmol) en metanol, se añade 1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidina] (0,258 g, 1,0 mmol) y NaCNBH<sub>3</sub> (0,273 g, 4,3 mmol). La mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 12 horas. La mezcla se diluye con agua (15 ml) y se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra. El material en bruto se purifica mediante TLC preparativa para dar el compuesto del título como un líquido incoloro (0,2 g, 33%). ESI/MS m/z 553,2 (M+H)<sup>+</sup>.

15

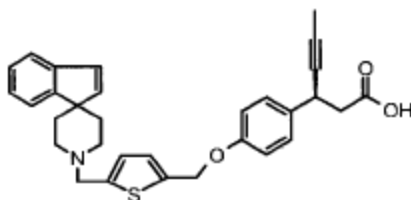
El compuesto siguiente se prepara esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento de preparación 67

Nº de prep.	Nombre químico	ESI/MS (m/z) (M+H)
66	3-[2-fluoro-4-[[4-metoxi-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoato de etilo	538

### Ejemplo 1

20 Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoico

Procedimiento A



25

A una solución de (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo (1,1 g, 2,0 mmol) en etanol (6 ml) se añade NaOH 5 M (0,83 ml, 4,1 mmol) y la mezcla se hace reaccionar bajo condiciones de microondas durante 5 minutos a 90°C. La mezcla se concentra, se disuelve en agua, se acidifica con HCl 2 N, y se extrae con cloroformo (2 x 50 ml). Los extractos combinados se lavan con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 ml), NH<sub>4</sub>Cl (2 x 5 ml), agua (2 x 5 ml) y salmuera saturada (2 x 5 ml), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra para dar el compuesto del título como un sólido blanco (0,746 g, 71%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 12,2 (bs, 1H), 7,43-7,41 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,31-7,25 (dd, J = 6,8 Hz, 3H), 7,21-7,13 (m, J = 7,2 Hz, 2H), 7,02-7,01 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,96-6,94 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,92-6,90 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 6,88-6,87 (d, J = 2,8 Hz, 1H) 6,77-6,76 (d, J = 5,2 Hz, 1H) 5,19 (s, 2H), 3,94 (s, 1H), 3,76 (s, 2H), 2,94-2,901 (t, J = 1 1,2 Hz, 2H), 2,59-2,57 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 2,41-2,36 (t, J = 1 1,2 Hz, 2H), 2,08-2,03 (t, J = 10,4 Hz, 2H), 1,76 (s, 3H), 1,22 (s, 2H), ESI/MS m/z 498 (M+H)<sup>+</sup>.

30

35

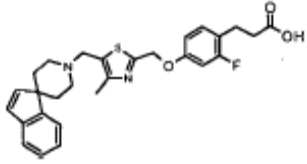
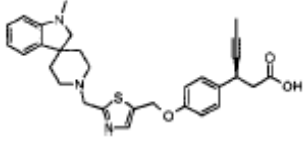
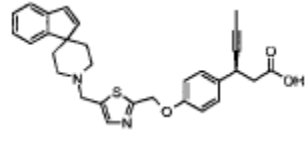
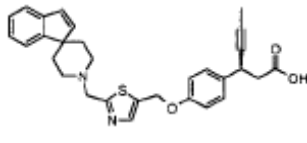
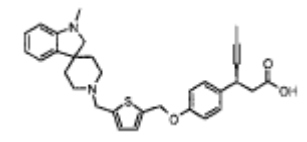
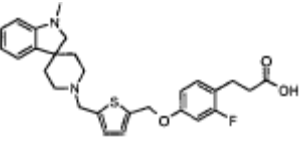
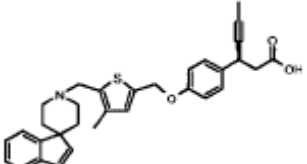
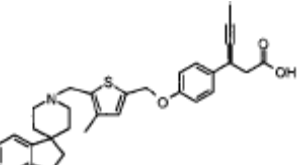
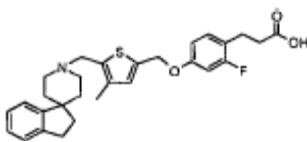
## Procedimiento B

Se disuelve (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoato de etilo (33,0 g, 62,7 mol) en etanol (600 ml) y la mezcla se enfría a 10-15°C. Se añade lentamente NaOH 5 M (5,02 g, 125,5 mmol) y la mezcla se agita durante 10 minutos seguido de calentamiento a 80°C durante 2 horas. El disolvente se evapora y la mezcla se disuelve en una cantidad mínima de agua. El pH se ajusta a ~7,0 con una solución de HCl 1 N. La solución se extrae con acetato de etilo (2 x 300 ml), se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora hasta la sequedad. Al material bruto se añade éter metílico de t-butilo (300 ml) y 0,2% de metanol y la mezcla se agita durante 30 minutos. El precipitado resultante se filtra y se seca bajo vacío a 48°C para dar el compuesto del título como un sólido de color crema (24,0 g, 76%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,217 (s, 1H), 7,438-7,421 (d, 1H), 7,330-7,271 (m, 3H), 7,228-7,126 (m, 2H), 7,046-7,039 (d, 1H), 6,978-6,906 (m, 4H), 6,795-6,781 (d, 1H), 5,213 (s, 2H), 3,972-3,928 (m, 1H), 3,788 (sa, 2H), 2,945 (m, 2H), 2,608-2,589 (d, 2H), 2,422 (m, 2H), 2,107-2,051 (m, 2H), 1,778-1,772 (s, 3H), 1,233-1,148 (m, 2H).

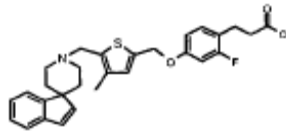
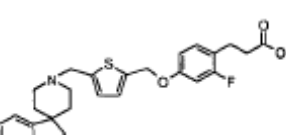
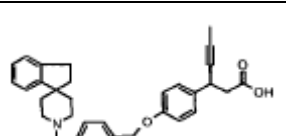
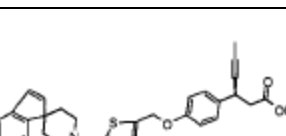
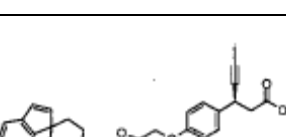
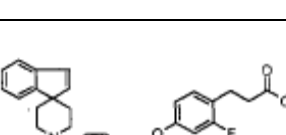
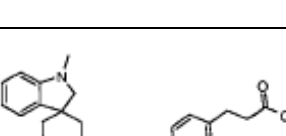
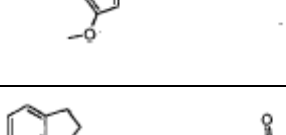
Los compuestos siguientes se preparan esencialmente tal como se ha descrito para el procedimiento del Ejemplo 1 (Procedimiento A)

Nº ej.	Nombre químico	Estructura	ESI/MS (m/z) (M+H)
2	Ácido (3S)-3-[4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-furil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		499
3	Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		485
4	Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)oxazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		483
5	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-furil]metoxi]fenil]propanoico		461
6	Ácido (3S)-3-[4-[[2-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		501
7	Ácido (3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		513

(Cont.)

8	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]propanoico		493
9	Ácido (3S)-3-[4-[[2-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		516
10	Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-2-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		499
11	Ácido (3S)-3-[4-[[2-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		499
12	Ácido (3S)-3-[4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		515
13	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		495
14	Ácido (3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		512
15	Ácido (3S)-3-[4-[[4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		514
16	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		494

(Cont.)

17	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[4-metil-5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		492
18	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		478
19	Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		500
20	Ácido (3S)-3-[4-[[4-metil-2-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)tiazol-5-il]metoxi]fenil]hex-4-enoico		513
21	Ácido (3S)-3-[4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-furil]metoxi]fenil]hex-4-enoico		482
22	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[5-(espiro[inden-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		478
23	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[4-metoxi-5-[(1-metilespiro[indolin-3,4'-piperidin]-1'-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		525
24	Ácido 3-[2-fluoro-4-[[4-metoxi-5-(espiro[indan-1,4'-piperidin]-1'-ilmetil)-2-tienil]metoxi]fenil]propanoico		510

5

Se cree que hay dos causas de la diabetes tipo 2, resistencia a la insulina e insuficiencia progresiva de las células beta pancreáticas para producir cantidades adecuadas de insulina para reducir los niveles de glucosa circulante. La resistencia a la insulina se desarrolla cuando los niveles normales de insulina son incapaces de eliminar la glucosa circulante en plasma en los tejidos diana, incluyendo el músculo esquelético y el tejido adiposo. A medida que el páncreas produce más insulina para compensar los niveles excesivamente altos de glucosa debido a la resistencia a la insulina, las células beta

pancreáticas eventualmente se ve superadas y no hay insulina adicional disponible para la secreción. Con el tiempo, las células beta pancreáticas fallan completamente y una persona con diabetes de tipo 2 se vuelve similar a una persona con diabetes de tipo 1. Los altos niveles de glucosa circulante son el sello distintivo de la diabetes y eventualmente pueden conducir a complicaciones graves, tales como enfermedades del corazón y derrames cerebrales, presión arterial alta, ceguera, daño renal y nervioso, infecciones y enfermedades de las encías. Por lo tanto, es importante controlar y tratar la diabetes de tipo 2 tan pronto como sea posible con ejercicio, una dieta adecuada, terapias antidiabéticas orales y finalmente con insulina. Los compuestos reivindicados por la presente invención proporcionan opciones de tratamiento farmacológico adicionales. Los compuestos que modulan selectivamente GPR40 pueden ser particularmente deseables.

Los resultados de estudios usando ratones transgénicos que sobreexpresan el gen GPR40 humano bajo el control del promotor de insulina II informado recientemente por Nagasumi apoyan además la tesis de que GPR40 desempeña un papel importante en la regulación de GDIS y los niveles de glucosa en plasma in-vivo, especialmente en modelos de roedores de resistencia a la insulina. Nagasumi K, et. al., Overexpression of GPR40 in pancreatic  $\beta$ -cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice Diabetes 58: 1067-1076, 2009. Véase también, Briscoe CP et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids, Journal Biological Chemistry 278: 11303 - 11311, 2003. Estos hallazgos apoyan adicionalmente la tesis de que el desarrollo de nuevos compuestos moduladores de GPR40 puede ser particularmente deseable para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

#### Ensayo de flujo de calcio primario

Los compuestos ejemplificados en la presente memoria se ensayan esencialmente tal como se describe a continuación y exhiben un valor  $EC_{50}$  para el ensayo de flujo de calcio primario menor de 1  $\mu$ M.

Este ensayo se usa para seleccionar compuestos midiendo el aumento en los niveles de calcio intracelular que resultan cuando un ligando se une a y activa GPR40, demostrando de esta manera la potencia y la eficacia de los agonistas de GPR40. Para este estudio se usan células HEK293 que sobreexpresan el ADNc GPR40 humano mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco con medio F12 en una proporción 3:1 suplementado con 10% de FBS y 800  $\mu$ g/ml de geneticina en 37°C y 5% de  $CO_2$ . Los ensayos de agonistas se realizan usando un kit de ensayo Calcium 4 Dye (Molecular Devices) en presencia (0,1%) o ausencia de ácido graso libre de BSA en el tampón de ensayo (1X HBSS (solución salina equilibrada de Hank) y HEPES 20 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico). La activación del receptor se mide como un aumento en el calcio intracelular usando el lector de placas de imágenes fluorométricas (FLIPR). El máximo cambio en la fluorescencia a lo largo de la línea de base se usa para determinar la respuesta agonista. El valor  $CE_{50}$  (concentración eficaz a la mitad de la respuesta máxima) del compuesto se calcula usando el software Excel Fit (versión 4; IDBS) representando la concentración en función de las unidades de fluorescencia relativa (RFU). El porcentaje de eficacia se calcula en base a la respuesta máxima exhibida por el compuesto en comparación con el ligando natural, ácido linoleico. El compuesto de ensayo del Ejemplo 1 tiene un valor  $EC_{50}$  de 114 +/- 93 nM con 91 +/- 9% de eficacia cuando se examina en este ensayo. Estos resultados demuestran además la potencia y la eficacia deseadas como agonistas de GPR40.

#### Ensayos de secreción de insulina dependiente de glucosa (GDIS)

Debido a que se conoce que la activación de GPR40 resulta en secreción de insulina que es dependiente de altas concentraciones de glucosa, se desarrollan dos sistemas de ensayo independientes (línea celular de insulinoma e islotes primarios de roedor) para caracterizar adicionalmente los compuestos que se sabe que aumentan el calcio intracelular en el ensayo GPR40 primario descrito anteriormente.

Los ensayos GDIS se realizan usando la línea celular de insulinoma de ratón Min6. Las células Min6 se mantienen en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene aminoácidos no esenciales, 10% de FBS, 2-mercaptoetanol 50 mM y 1% de penicilina y estreptomycin a 37°C más el 5% de  $CO_2$ . En el día del experimento, las células se lavan dos veces con 200  $\mu$ l de tampón de Krebs-Ringer sin glucosa pre calentado. La adición de 200  $\mu$ l de tampón de Krebs-Ringer pre-calentado que contiene glucosa 2,5 mM se usa para mantener las células privadas de glucosa, seguido de la adición de compuestos en presencia de una alta concentración de glucosa (25 mM). La placa se incubaba a 37°C durante 2 horas. Al final de la incubación de 2 horas, el sobrenadante se transfiere suavemente a una placa de filtro Millipore y se centrifuga a 200 g (fuerza de la gravedad) durante 3 minutos. La insulina se ensaya usando un kit de estimación de insulina Mercodia. La adición del Ejemplo 1 a 1  $\mu$ M más glucosa 25 mM a las células Min6 resultó en un aumento estadísticamente significativo de dos veces en la secreción de insulina en comparación con la conseguida solo con glucosa 25 mM.

Los ensayos GDIS usando islotes pancreáticos de Langerhans primarios de roedores se usan también para caracterizar los compuestos ejemplificados. Los islotes pancreáticos se aíslan a partir de ratas SD (Sprague Dawley) macho por digestión con colagenasa y separación en gradiente de densidad Histopaque. Los islotes se cultivan durante la noche en medio RPMI-1640 con GlutaMAXn (forma estabilizada de dipéptido L-glutamina (Invitrogen n° de catálogo 61870-010))

para facilitar la recuperación desde el proceso de aislamiento. La secreción de insulina se determina mediante una incubación de 90 minutos en tampón EBSS (solución salina equilibrada de Earle) en una placa de 48 pocillos. Brevemente, los islotes se preincuban primero en EBSS con glucosa 2,8 mM durante 30 minutos y, a continuación, se transfieren a una placa de 48 pocillos (cuatro islotes/pocillo) que contienen 150  $\mu$ l de glucosa 2,8 mM y se incuban con 150  $\mu$ l de EBSS con glucosa 2,8 o 11,2 mM en presencia o ausencia de compuestos de ensayo durante 90 minutos. El tampón se elimina de los pocillos al final de la incubación y se ensaya para determinar los niveles de insulina usando el kit ELISA de insulina de rata (Mercodia). En este sistema de ensayo, la administración del Ejemplo 1 a diferentes concentraciones resulta en un aumento de 2 a 4 veces de la insulina en comparación con la conseguida solo con glucosa 11,2 mM.

#### 10 Ensayos de selectividad:

##### Ensayos de unión y funcionales de receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) $\alpha$ , $\delta$ y $\gamma$ :

Debido a que se conoce que GPR40 es activado por ligandos a PPAR $\gamma$ , los compuestos ejemplificados se examinan en ensayos de unión y funcionales de PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , y PPAR $\gamma$  para determinar la selectividad de los compuestos ejemplificados para GPR40. Los compuestos ejemplificados en la presente memoria se ensayan esencialmente tal como se describe a continuación para la unión a PPAR y, generalmente, tienen valores de unión mayores que 1.000 nM con concentraciones 10  $\mu$ M de compuesto de ensayo y, de esta manera, se consideran negativos para la actividad PPAR.

Las afinidades de unión de los compuestos para los receptores PPAR  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  se evaluaron usando la tecnología de ensayo de proximidad de centelleo (SPA). Se usa repetición directa 2 (DR2) de oligonucleótido biotinilado para unir los receptores a perlas de SPA revestidas con estreptavidina y silicato de itrio. PPAR  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y el receptor retinoide X (RXR) son sobreexpresados en las células HEK293, y los lisados celulares que contienen los receptores específicos se usan en los ensayos individuales. El DR2 se une a las perlas de SPA durante un período de 30 minutos en un tampón de unión que contiene HEPES 10 mM pH 7,8, KCl 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, DTT 1 mM, 0,5% de ácido 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-propanosulfónico (CHAPS) y 4,4% de suero bovino. Los lisados celulares se incuban en cada pocillo con una de entre 11 concentraciones de compuesto en presencia de un compuesto de referencia agonista dual de PPAR  $\alpha/\delta$  radio-marcado ( $\sim$ 0,033.8  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H) para los ensayos de los ensayos de receptores alfa y delta y un compuesto de referencia antagonista de PPAR $\gamma$  radiomarcado ( $\sim$ 0,037.3  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H) para los ensayos de receptor gamma, 110,3  $\mu$ g de perlas revestidas con estreptavidina itrio SPA, 0,126 nM HD Oligo DR2, y cualquiera de entre 0,3  $\mu$ g de PPAR $\alpha$  con 0,5  $\mu$ g de RXR $\alpha$ , 0,5  $\mu$ g de PPAR  $\delta$  con 0,5  $\mu$ g RXR $\alpha$ , o 1,25  $\mu$ g de PPAR $\gamma$  con 3,03  $\mu$ g de RXR $\alpha$  en el tampón de unión anterior más 14% de glicerol y 5  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón cortado. La unión no específica se determina en presencia de 10.000 nM del compuesto de referencia agonista dual de PPAR  $\alpha/\delta$ , no marcado, para los ensayos de receptores alfa y delta y el compuesto de referencia agonista de PPAR $\gamma$  para el ensayo de receptor gamma. La reacción de unión (100  $\mu$ l por pocillo en una placa de 96 pocillos [Costar 3632]) se incuba durante 10 horas y se realiza un recuento de desintegraciones por minuto (dpm) en un dispositivo Wallac Microbeta. La afinidad de unión al receptor (IC<sub>50</sub>) para los compuestos se determina mediante el ajuste de una curva de concentración-respuesta de 11 puntos con una ecuación logística de 4 parámetros. Se determina K<sub>i</sub> a partir del valor IC<sub>50</sub> usando la ecuación de Cheng-Prussoff y se determina K<sub>d</sub> por la unión de saturación. Para el compuesto del Ejemplo 1, no se detecta ninguna unión en ninguno de los tres ensayos de unión de PPAR con concentraciones de hasta 10  $\mu$ M. De esta manera, los ensayos expuestos en la presente memoria apoyan la tesis de que el compuesto del Ejemplo 1 activa selectivamente GPR40 evitando al mismo tiempo la actividad PPAR no deseada. Los valores IC<sub>50</sub> relativos de los compuestos ejemplificados son generalmente mayores de 10  $\mu$ M para las isoformas de PPAR, lo cual apoya la tesis de que los compuestos evitan la actividad PPAR mientras al mismo tiempo proporcionan la activación de GPR40 deseada.

Los ensayos funcionales de indicadores Gal4 PPAR $\alpha$ , Gal4 PPAR $\delta$ , y PPAR $\gamma$  se usan también para controlar la selectividad de los compuestos ejemplificados. Células CV1, derivadas del tejido renal de un mono verde africano, se transfectan con diversos plásmidos indicadores y receptores usando Fugene. Para los ensayos de Gal4 PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$ , un plásmido indicador que contiene cinco copias en tándem del elemento de respuesta Gal4 de proteínas de transcripción de levadura, clonado aguas arriba de un gen de la luciferasa de luciérnaga dirigido por el promotor tardío principal de adenovirus, se transfecta junto con un plásmido dirigido por virus de simio 40 (SV40) que expresa constitutivamente una proteína híbrida que contiene el dominio de unión a ADN de Gal4 (DBD), y cualquiera de entre la unión de ligando PPAR $\alpha$  o PPAR $\delta$ . Para el ensayo de PPAR $\gamma$ , los plásmidos que codifican PPAR $\gamma$  y RXR $\alpha$ , ambos dirigidos por un promotor de citomegalovirus (CMV), se transfectan junto con un plásmido que contiene ADNc indicador de luciferasa dirigido por el promotor TK y un elemento de respuesta del receptor (2X PPRE). Las células se transfectan en matraces de cultivo celular T225cm<sup>2</sup> en medio DMEM con 5% de FBS tratado con carbón vegetal. Después de una incubación durante la noche, las células transfectadas se tratan con tripsina, se siembran en placas opacas de 96 pocillos (15.000 células/pocillo) en medios DMEM que contienen 5% FBS tratado con carbón vegetal, se incuban durante 4 horas, y se exponen a entre 0,17 nM y 10  $\mu$ M de compuestos de ensayo o compuesto de referencia en diluciones semilogarítmicas. Después de 24 horas de incubación con los compuestos, las células se lisan y la actividad de luciferasa se determina como una medida de la activación del receptor por luminiscencia. Los datos se ajustan a un modelo logístico de ajuste de 4 parámetros para determinar los valores EC<sub>50</sub>. Se determina el porcentaje de estimulación máxima en función de a la

estimulación máxima obtenida con 10  $\mu$ M de un compuesto de referencia agonista de PPAR apropiado. No se detecta activación funcional de PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  o PPAR $\gamma$  con el compuesto del Ejemplo 1 cuando se examina hasta 10  $\mu$ M en los ensayos co-transfección PPAR específica (CTF) /funcionales descritos anteriormente. De esta manera, el ensayo apoya la tesis de que los compuestos ejemplificados evitan la actividad agonista de PPAR, tal como se desea.

5 Eficacia in vivo: ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT)

Para examinar la capacidad de los compuestos ejemplificados para activar GPR40 in-vivo que resulta en la eficacia anti-diabética, es decir, un aumento de la insulina y una reducción en los niveles de glucosa, se completa un estudio de 4 días de ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) con cada compuesto ensayado en la IPGTT.

10 Ratones Balb/c (ratones albinos) macho (8-9 semanas de edad) son alojados individualmente y alimentados con una dieta con comida para roedores normal y agua *ad libitum*. Los animales se pesan y se asignan aleatoriamente por peso corporal y se registran los pesos corporales diariamente. Una vez iniciado el estudio, a los animales se les dosifica una vez al día por vía oral durante tres días usando una formulación que incluye metilcelulosa y Tween-80. En la noche anterior al estudio IPGTT de 4 días, los animales se mantienen en ayunas durante la noche en jaulas limpias. En la mañana de la IPGTT (Día 4), los animales se dosifican oralmente con compuesto o solo vehículo 60 minutos antes de la

15 IPGTT (glucosa 2 g/kg, i.p.). Los niveles de glucosa en sangre se determinan a partir de muestras de sangre tomadas de la cola tomadas 0, 3, 7, 15, 30 y 60 minutos después de la exposición a la glucosa. El plasma se aísla y se usa para estimar los niveles de insulina respectivos. El perfil de excursión de la glucosa en sangre desde t = 0 a t = 60 minutos se usa para integrar un área bajo la curva (AUC) para cada tratamiento. El porcentaje de reducción en la glucosa se calcula a partir de los datos AUC de los compuestos con respecto al AUC del grupo con vehículo. El compuesto de ensayo se

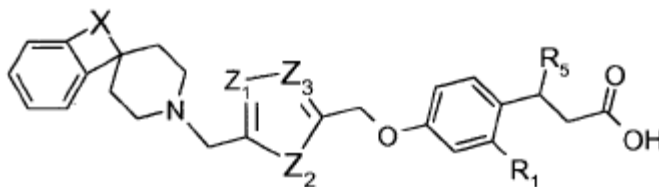
20 administra por vía oral a 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 o 10 mg/kg, y un control positivo se administra a 10 mg/kg. Ninguna concentración del compuesto del Ejemplo 1 o el control positivo redujo significativamente los niveles de glucosa en el punto temporal de 3 minutos durante el GTT. Por el contrario, los niveles de glucosa se reducen significativamente con la dosis 0,3, 1,0, 3,0 y 10 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1 y el control positivo en el punto temporal de 7 minutos y con una dosis de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1 en los puntos temporales 15, 30 y 60 minutos. El control positivo redujo significativamente los niveles de glucosa en los puntos temporales correspondientes a 30 y 60 minutos. El valor ED<sub>50</sub> para el compuesto del Ejemplo 1 basado en AUC para reducir la glucosa es de 0,21 mg/kg. En este estudio, los niveles de insulina se elevaron significativamente a la dosis de 3,0 y 10,0 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1, lo cual es coherente con la activación de GPR40. Los resultados de este estudio demuestran que la activación de GPR40 en el Ejemplo 1 conduce a la eficacia anti-diabética *in vivo*.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula

5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que:

10

$R_1$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H, F y Cl;

$R_5$  es H o  $-C\equiv CCH_3$ ;

X se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH=CH-$ , y  $-N(R_7)CH_2-$ ;

$R_7$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H y alquilo  $C_{1-3}$ ;

$Z_1$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-C(R_3)-$  y  $-N-$ ;

15

$R_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H,  $OCH_3$ ; y  $CH_3$ ;

$Z_2$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-S-$  y  $-O-$ ;

$Z_3$  se selecciona de entre el grupo que consiste en  $-C(R_4)-$  y  $-N-$ ;

$R_4$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H,  $OCH_3$  y  $CH_3$ ; y

en la que al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en  $Z_1$  y  $Z_3$  es  $-C(R_3)-$  o  $-C(R_4)-$ .

20

2. Compuesto o sal del mismo según la reivindicación 1, en el que  $R_1$  es H.

3. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que  $R_5$  es  $-C\equiv CCH_3$ .

4. Compuesto o sal del mismo según la reivindicación 3, en el que el compuesto es el isómero S.

5. Compuesto o sal del mismo según la reivindicación 1, en el que  $R_1$  es F y  $R_5$  es H.

6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que  $Z_2$  es  $-S-$ .

25

7. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que  $Z_1$  es  $-C(R_3)-$ .

8. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que  $R_3$  es H o  $CH_3$ .

9. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que  $Z_3$  es  $-C(R_4)-$ .

10. Compuesto o sal del mismo según la reivindicación 9, en el que  $R_4$  es H.

11. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que X es  $-CH=CH-$ .

30

12. Compuesto o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que X es  $-N(R_7)CH_2-$ .

13. Compuesto o sal del mismo según la reivindicación 12, en el que  $R_7$  es  $CH_3$ .

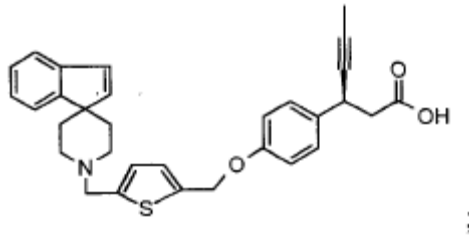
14. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.

15. Compuesto según la reivindicación 1 de Fórmula

35



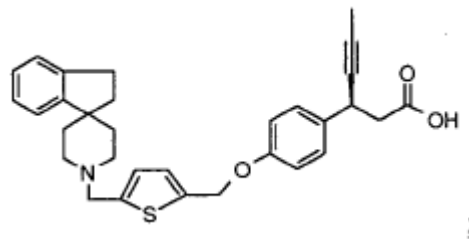
5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. Compuesto según la reivindicación 1 de Fórmula

10



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

17. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, que comprende además otro agente farmacéutico.

20 19. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia.

20. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la diabetes.