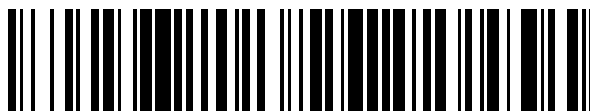


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 165**

51 Int. Cl.:

C07D 409/06 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12748334 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2744806**

54 Título: **Nuevo derivado de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina útil para el tratamiento de diabetes**

30 Prioridad:

17.08.2011 US 201161524462 P

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

21.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HAMDOUCHI, CHAFIQ

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 578 165 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

Nuevo derivado de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina útil para el tratamiento de diabetes

La diabetes es un problema de atención sanitaria grave al que se enfrenta el mundo en desarrollo. Sería deseable proporcionar un tratamiento oral seguro y efectivo para la diabetes. Se cree que algunos tratamientos orales exitosos disponibles comercialmente para la diabetes tipo 2 (T2D) actúan a través de la modulación del receptor gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR). La administración de estas medicinas se ha asociado con efectos adversos indeseados que algunas veces incluyen hipoglicemia, daño hepático, enfermedad gastrointestinal, ganancia de peso, u otros efectos indeseados que pueden estar asociados con la actividad de gama PPAR. Se desean nuevas opciones de tratamiento que ofrezcan un perfil de seguridad más deseable para gestionar la TD2 para tratar o prevenir efectivamente la diabetes en muchos pacientes. En particular, se desean especialmente procedimientos de tratamiento basados en mecanismos novedosos que puedan minimizar o evitar los efectos que han sido asociados con la activación de gama PPAR.

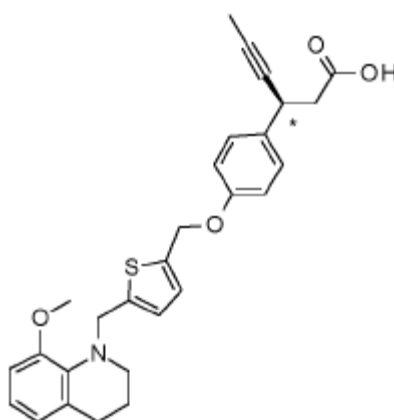
Se ha informado de que el receptor 40 acoplado a la proteína G (GPR-40), conocido también como receptor 1 de ácido graso libre (FFA1 o FFAR1), se expresa predominantemente a altos niveles en células beta pancreáticas de roedor, líneas de células de insulinoma e isletas humanas. Este receptor es activado por ácidos grasos de cadena larga y media. La dependencia de la glucosa de la secreción de insulina es una característica importante de la activación de GPR-40, convirtiendo este receptor en un objetivo excelente para el desarrollo de terapias eficaces con un perfil de seguridad deseado para su uso en el tratamiento de T2D. Los compuestos que ofrecen eficacia y un perfil de seguridad más deseable en comparación con terapias existentes, tales como insulina y sulfonilureas, pueden ser especialmente deseables.

Dos solicitudes de patente publicadas recientemente, US20110092531 y W02011066183 divulgan compuestos que poseen un grupo espiro-bicíclico que exhibe actividad GPR-40.

Esta invención proporciona un compuesto para el tratamiento de diabetes, particularmente T2D. El compuesto para esta invención es un potente activador de GPR-40. Esta invención proporciona una novedosa opción de tratamiento deseada que actúa a través de un mecanismo farmacológico que es único en comparación con los tratamientos disponibles comercialmente y además proporciona un compuesto que activa selectivamente GPR-40 en comparación con gama PPAR.

El perfil farmacológico del compuesto de esta invención, como un activador de GPR-40 selectivo, puede ser particularmente deseable para su uso en el tratamiento de T2D. Además, la modulación GPR-40 selectiva puede proporcionar un perfil de seguridad particularmente deseable para su uso en el tratamiento de T2D evitando los efectos asociados con la modulación gama PPAR.

La presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I siguiente:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto de la presente invención puede tener un carbono quiral identificado en la estructura anterior con un asterisco (*). El compuesto preferente tiene la configuración mostrada anteriormente, la cual por convención se conoce como la configuración S.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I tal como se ha descrito anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

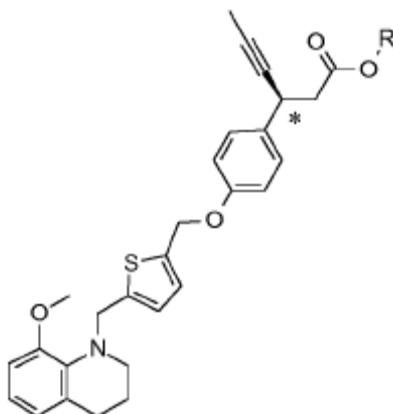
5 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I tal como se ha descrito anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona un compuesto según la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia.

10 En todavía otra forma, la presente invención proporciona un compuesto tal como se ha descrito anteriormente según la Fórmula I, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes en un mamífero que lo necesita. Preferentemente, el uso es para el tratamiento de la diabetes de tipo dos y el mamífero es un ser humano.

15 La presente invención proporciona el uso de un compuesto según la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes. Preferentemente, el medicamento es para el tratamiento de la diabetes de tipo dos y para el tratamiento de mamíferos, particularmente seres humanos.

En otra forma más, la presente invención proporciona un compuesto intermedio de la Fórmula II



II.

30 en la que R se selecciona de entre alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, cicloalquilo C₃₋₆, alquilo C₁₋₄-cicloalquilo C₃₋₆, fenilo y alquilfenilo C₁₋₅ para proporcionar un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los grupos R preferentes incluyen alquilo C₁₋₂, haloalquilo C₁₋₂, fenilo y alquilfenilo C₁₋₂. Los grupos R particularmente preferentes incluyen metilo, etilo, fenilo y bencilo.

35 La presente invención proporciona también un procedimiento de preparación de ácido (3S)-3-[4-[[5-[(8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-inoico descrito anteriormente para la Fórmula I. El procedimiento comprende desproteger o desesterificar el compuesto intermediario según la Fórmula II para preparar el compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Una persona con conocimientos en la materia entenderá fácilmente y será capaz de implementar reacciones de desprotección sin experimentación indebida. Esas personas con conocimientos en la materia reconocerán que, además del ácido carboxílico y ácido carboxílico protegido, pueden usarse otros grupos funcionales que pueden ser convertidos fácilmente a un ácido carboxílico en lugar del ácido carboxílico o ácido protegido. Dichos grupos funcionales, preparaciones y transformaciones de estos grupos en ácidos carboxílicos pueden encontrarse en "Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations" por Larock. R.C, Wiley VCH, 1999 y en "March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure" Smith, M.B., y March, J., Wiley-Interscience, 6ª Ed. 2007.

45 El compuesto de la presente invención, el ácido (3S)-3-[4-[[5-[(8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-inoico, puede proporcionarse como una sal farmacéuticamente aceptable. "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales del compuesto de la invención consideradas como aceptables para uso clínico y/o veterinario.

Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, N° 1, Enero 1977.

5 La expresión "vehículo, diluyente o excipientes farmacéuticamente aceptables" significa que el vehículo, diluyente y los excipientes son farmacéuticamente compatibles con los otros ingredientes de la composición.

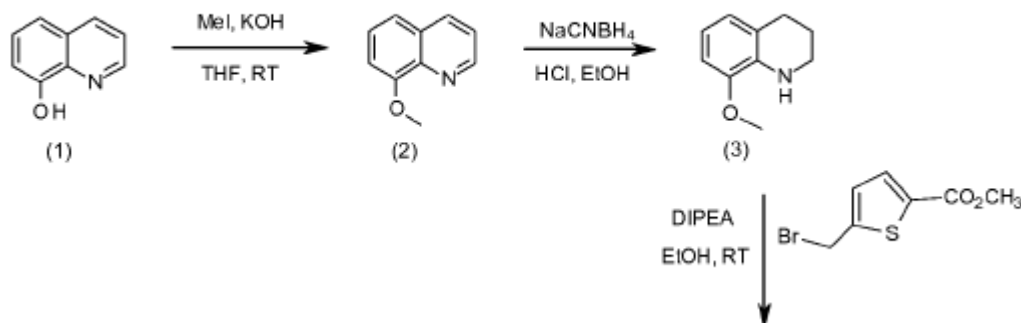
10 Ciertos sustituyentes han sido eliminados en los siguientes Esquemas en aras de la claridad y no se pretende limitar en modo alguno las enseñanzas de los Esquemas. Además, los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales pueden ser separados en cualquier punto conveniente en la síntesis del compuesto de Fórmula I por medio de procedimientos tales como cromatografía quiral. Además, los intermediarios descritos en los Esquemas y las preparaciones siguientes contienen un número de grupos de nitrógeno, hidroxilo y protectores de ácido, tales como ésteres. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por la persona con conocimientos en la materia y se describen en la literatura. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, (T. Greene y P. Wuts, eds., 2ª ed. 1991).

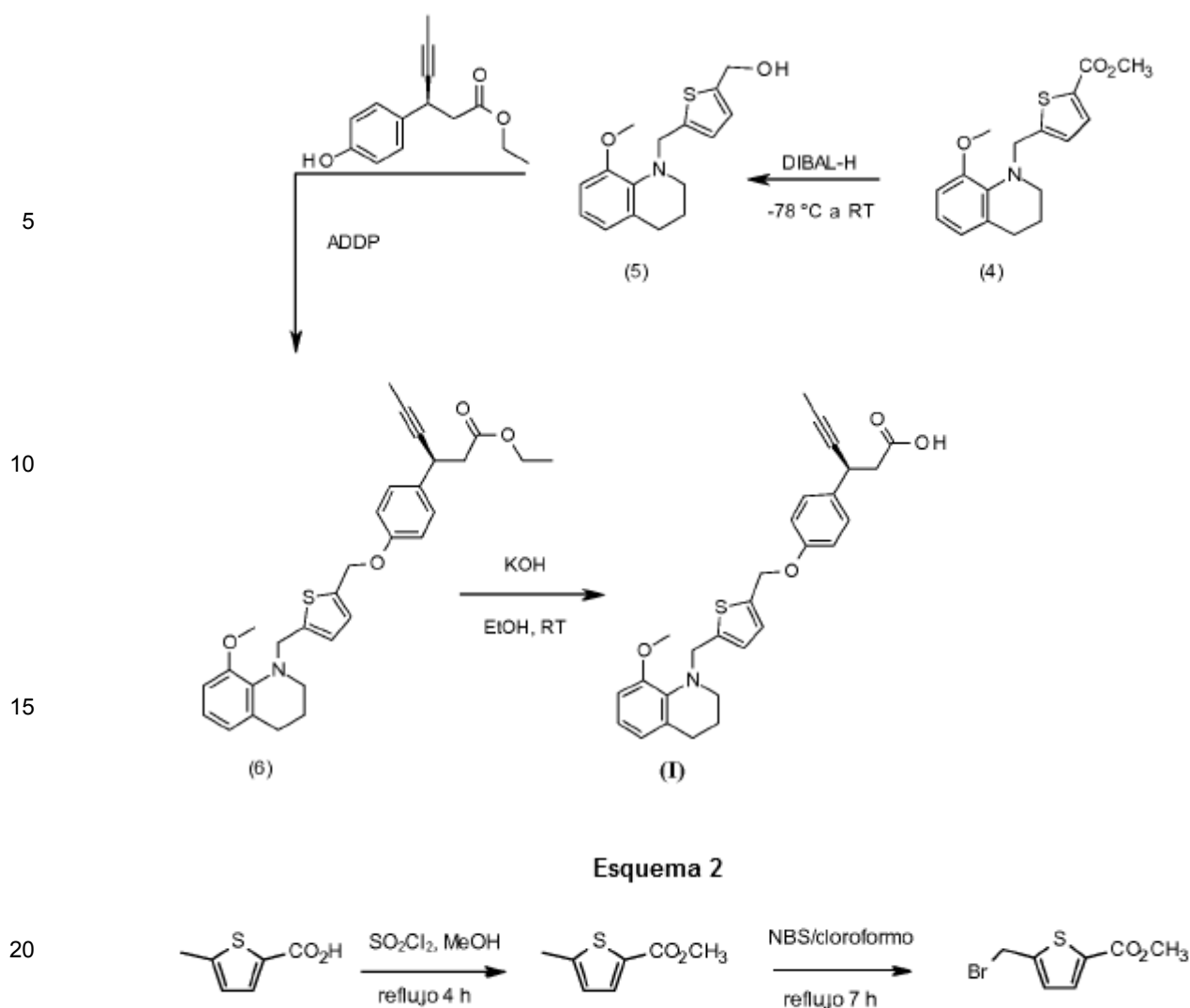
15 Las abreviaturas usadas en la presente memoria se definen según Aldrichimica Acta, Vol. 17, No. 1, 1984. Otras abreviaturas se definen como se indica a continuación: "ADDP" se refiere a 1-(azodicarbonil)dipiperidina; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DIBAL-H" se refiere a hidruro de diisobutilaluminio; "DIPEA" se refiere a diisopropiletil amina; "DMEM" se refiere a medio Eagle modificado por Dulbecco; "DTT" se refiere a ditioneitol; "ESI" se refiere a ionización por electropulverización; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a alcohol etílico o etanol; "F12" se refiere a medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "IC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "MeOH" se refiere a alcohol metílico o metanol; "NBS" se refiere a N-bromosuccinimida; "PPAR" se refiere a receptor activado por proliferador de peroxisoma; "PPRE" se refiere a elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma; "RFU" se refiere a unidad de fluorescencia relativa; "RPMI" se refiere a Roswell Park Memorial Institute; "RT" se refiere a temperatura ambiente; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; y "TK" se refiere a timidina cinasa.

30 El término alquilo, tal como se usa en la presente memoria, es una cadena alquilo recta tal como etilo o n-propilo, o una cadena alquilo ramificada tal como isopropilo o ter-butilo. El término haloalquilo C₁₋₄ se refiere a un grupo alquilo que tiene 1, 2, 3 o más grupos halo unidos a los carbonos de la cadena alquilo. Si hay dos o más halógenos, no es necesario que los halógenos estén unidos al mismo carbono. Este término incluye también perhaloalquilos en los que todos los átomos de nitrógeno del grupo alquilo se reemplazan con un halógeno.

35 En los esquemas de reacción siguientes, a menos que se indique lo contrario, todos los sustituyentes son tal como se ha definido previamente. Los reactivos y los materiales de partida son en general fácilmente disponibles para una persona con conocimientos ordinarios en la materia. Otros pueden ser elaborados mediante técnicas estándares de química orgánica y heterocíclica, que son análogas a las síntesis de compuestos conocidos, estructuralmente similares, y los procedimientos siguientes descritos en las Preparaciones y los Ejemplos incluyen cualquier procedimiento novedoso.

Esquema 1





Preparaciones y Ejemplos

25 Las siguientes Preparaciones y Ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica del compuesto de Fórmula (I). Los compuestos son nombrados por IUPACNAME ACDLABS o Symyx Draw 3.2.

Preparación 1

8-Metoxiquinolina

30 Añadir hidróxido de potasio (435 g, 7,76 mol) a una solución de 8-hidroxi quinolina (250 g, 1,724 mol) en THF (10 l) a temperatura ambiente y agitar. Añadir yoduro de metilo (435 g, 2,58 mol) gota a gota y agitar durante la noche. Filtrar la mezcla de reacción y lavar el sólido con THF (2 l). Concentrar la solución hasta la sequedad; añadir agua; extraer con diclorometano (2 x 3 l); combinar las capas orgánicas; y lavar con salmuera. Recoger las capas orgánicas y secar sobre sulfato de sodio. Eliminar los sólidos mediante filtración. Recoger el filtrado y concentrar bajo presión reducida para dar un aceite rojo, el cual solidifica en reposo, para dar el compuesto del título (281 g, 102%), el cual puede ser usado sin purificación adicional. ESI (m/z) 160(M+H).

Preparación 2

8-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina

35 Añadir cianoborohidruro de sodio (505 g, 8,11 mol) en EtOH (1 l) a una solución de 8-metoxi quinolina (425 g, 2,673 mol) en EtOH (9 l), y agitar. Enfriar la mezcla de reacción a una temperatura interna de 0°C y añadir HCl (35%, 1,12 l, 10,962 mol) gota a gota durante 60 minutos de manera que la temperatura interna no se eleve por encima de 20°C. Permitir que

la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente y después calentar a reflujo durante 2,5 horas. Enfriar a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Añadir hidróxido de amonio (25%, 1 l); diluir con agua (15 l); y extraer la mezcla con diclorometano (3 x 10 l). Combinar las capas orgánicas y secar sobre sulfato de sodio. Eliminar los sólidos mediante filtración. Recoger el filtrado y concentrar bajo presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo mediante cromatografía flash en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:hexano (1:10) para dar el compuesto del título (357 g, 82%). ESI (m/z) 164 (M+H).

Preparación 3

Metil-5-metiltiofen-2-carboxilato

Añadir cloruro de tionilo (153 ml, 2,1 mol) gota a gota durante 20 minutos a una solución de ácido 5-metiltiofen-2-carboxílico (100 g, 0,703 mol) en MeOH (1 l) a 0°C y agitar. Una vez completada la adición, calentar la mezcla de reacción a reflujo durante 3,5 horas. Enfriar y concentrar en vacío para dar un aceite espeso. Diluir el aceite con EtOAc (500 ml) y lavar secuencialmente con agua (300 ml), a continuación, con salmuera (300 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio. Eliminar los sólidos mediante filtración. Recoger el filtrado y concentrar bajo presión reducida para dar el compuesto del título (106 g, 97%), el cual se usa sin purificación adicional. ESI (m/z) 156 (M+H).

Preparación 4

Metil 5-(bromometil)tiofen-2-carboxilato

Añadir NBS recristalizada recientemente (323,8 g, 1,81 mol) a una solución de metil-5-metiltiofen-2-carboxilato (258 g, 1,65 mol) en cloroformo (2,6 l) a temperatura ambiente, y agitar. Añadir peróxido de benzoilo (3,99 g, 0,016 mol) y calentar la mezcla de reacción a reflujo durante 7 horas. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y filtrar a través de tierra diatomácea. Lavar la torta de filtro con cloroformo (250 ml). Recoger las capas orgánicas y eliminar el solvente para dar el compuesto del título (388 g, 100%), el cual se usa sin purificación adicional. ESI (m/z) 236 (M+H).

Preparación 5

Metil-5-[(8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil]tiofen-2-carboxilato

Añadir metil-5-(bromoetil)tiofen-2-carboxilato (432,5 g, 1,84 mol) en EtOH (500 ml) a una solución de 8-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (300 g 1,84 mol) en EtOH (1 l) y agitar. Añadir DIPEA (641 ml, 3,67 mol) gota a gota y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Una vez completada la reacción, eliminar el EtOH en vacío, y añadir agua (5 l). Extraer la fracción acuosa con EtOAc (3 x 3 l); combinar las capas orgánicas; y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar la solución y concentrar bajo presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo mediante cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (6:94) para dar el compuesto del título (325 g, 56%). ESI (m/z) 318 (M+H).

Preparación 6

(5-[(8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil]-2-tienil]metanol

Añadir DIBAL-H (1 M en tolueno 2,7 l, 2,66 mol) lentamente mediante una cánula durante un periodo de 1,5 horas a una solución agitada de metil-5-(8-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)metil)tiofen-2-carboxilato (281 g, 0,886 mol) en THF (4 l) a -70°C. Supervisar la terminación de la reacción mediante cromatografía de capa delgada (TLC). Una vez completada la reacción, permitir que la mezcla de reacción se caliente a 20°C y añadir una solución saturada de cloruro de amonio. Añadir una solución de tartrato de potasio sódico (1,3 kg en 5 l de agua), y agitar durante la noche. Separar la capa orgánica; extraer la fase acuosa con EtOAc (2 x 5 l); a continuación, combinar las capas orgánicas; y secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio. Eliminar los sólidos mediante filtración. Eliminar el solvente del filtrado bajo presión reducida para dar el compuesto del título como un sólido blanco (252 g, 98%). ESI (m/z) 290 (M+H).

Preparación 7

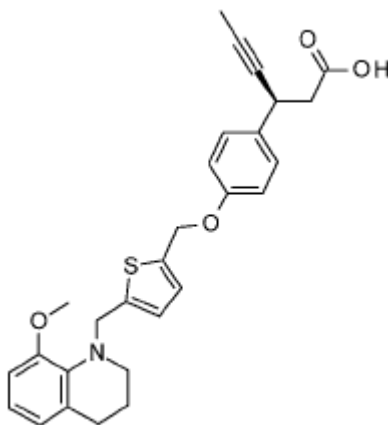
Etil (3S)-3-[4-[[5-((8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil)-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-ionato

Añadir tributilfosfina (50% solución en EtOAc, 543 ml, 1,34 mol) a una solución de ADDP (282,5 g, 1,5 eq) en THF (3 l) y enfriar la mezcla a una temperatura interna de 0°C, después agitar durante 15 minutos. Añadir 3-(4-hidroxifenil)hex-4-ionato de (S)-etilo (173,5 g, 0,747 mol) en THF (3 l) gota a gota durante 15 minutos; a continuación añadir 5-((8-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)metil)tiofen-2-il)metanol (216 g, 0,747 mol) en THF (5 l) gota a gota. Permitir que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Filtrar la mezcla de reacción a través de tierra diatomácea y lavar la torta de filtro con acetato de etilo (2 l). Concentrar el filtrado orgánico hasta la sequedad. Añadir agua (4 l); extraer con acetato de etilo (3 x 5 l); combinar las capas orgánicas; y secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio. Eliminar los sólidos mediante filtración y concentrar bajo presión reducida para dar un aceite. Purificar el residuo mediante cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (6:94) para dar el

compuesto del título (167 g, 44%). ESI (m/z) 504 (M+H).

Ejemplo 1

Ácido (3S)-3-[4-[[5-[(8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il)metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-inoico



Añadir una solución de hidróxido de potasio (49,76 g, 0,88 mol) en agua (372 ml) a una solución de (S)-etil-3-(4-((5-8-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)metil)tiofen-2-il)metoxi)fenil]hex-4-ionato (149 g, 0,296 mol) en EtOH (1,49 l) a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta la sequedad y añadir agua (1,3 l). Extraer la solución resultante con EtOAc (2 x 300 ml) y separar. Ajustar el pH de la capa acuosa a pH = 6 con HCl 2 N. Recoger los sólidos resultantes. Recristalizar los sólidos a partir de MeOH caliente (298 ml, 2 vol) para dar el compuesto del título (91 g, 65%). ESI (m/z) 476 (M+H).

GPR40: Información

Los resultados de estudios usando ratones transgénicos que sobre-expresan el gen GPR40 humano bajo control del promotor de la insulina II proporcionados recientemente por Nagasumi apoyan adicionalmente la tesis de que el GPR40 desempeña un papel importante en GDIS y en la regulación de 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 β -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 que el desarrollo de nuevos compuestos moduladores de GPR40 puede ser particularmente deseado para su uso en el tratamiento de T2D.

Ensayo primario de flujo de calcio

El compuesto de Ejemplo 1 se ensaya esencialmente tal como se describe a continuación y exhibe un valor EC_{50} para el ensayo primario de flujo de calcio menor de 1 μ M.

Este ensayo se usó para seleccionar compuestos mediante la medición del incremento de los niveles de calcio intracelular que resultan cuando un ligando se une y activa GPR40, demostrando de esta manera la potencia y la eficacia de los agonistas de GPR40. Para el estudio, se usan células HEK293 que sobre-expresan el ADNc del GPR40 humano, mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco con medio F12 en una relación 3:1 suplementadas con 10% de FBS y 800 μ g/ml de geneticina a 37°C y 5% de CO_2 . Los ensayos agonistas se realizan usando un kit de ensayo Calcium 4 Dye (Molecular Devices) en presencia de 0,1% de BSA libre de ácido graso en el tampón de ensayo (1x HBSS (solución salina balanceada de Hank) y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinotansulfónico) 20 mM. La activación del receptor se mide como un incremento en el calcio intracelular usando el dispositivo lector Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). Se usa el máximo cambio en fluorescencia con relación a la línea base para determinar la respuesta agonista. Se calcula un valor EC_{50} (concentración efectiva a la mitad de la respuesta máxima) del compuesto usando el software Excel Fit (versión 4; IDBS) trazando una gráfica de la concentración en función de las unidades de fluorescencia relativa (RFUs). El porcentaje de eficacia se calcula en base a la respuesta máxima presentada por el compuesto en comparación con el ligando natural, ácido linoleico. El compuesto de ensayo del Ejemplo 1 tiene un EC_{50} de 152 +/- 52 nM con 84 +/- 24% de eficacia cuando se examina en este ensayo. Estos resultados demuestran adicionalmente la potencia y la eficacia deseadas de este compuesto como un agonista de GPR40.

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

Debido a que se conoce que la activación de GPR40 resulta en la secreción de insulina, la cual es dependiente de altas concentraciones de glucosa, se desarrollan dos sistemas de ensayo separados (una línea celular de insulinoma e isletas de roedor primarias) para caracterizar adicionalmente los compuestos que se conoce que incrementan el calcio intracelular en el ensayo primario de GPR40 descrito anteriormente.

5 Se realizan ensayos GDIS usando la línea celular de insulinoma de ratón Min6. Las células Min6 se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene aminoácidos no esenciales, 10% de FBS, 2-mercaptoetanol 50 mM y 1% de penicilina y estreptomina a 37°C más 5% de CO₂. El día del experimento, las células se lavan dos veces con 200 µl de tampón de enjuague de Krebs pre-calentado sin glucosa. La adición de 200 µl de tampón de enjuague Krebs pre-calentado que contiene glucosa 2,5 mM se usa para someter a inanición las células, seguida por la adición de
10 compuestos en presencia de una alta concentración de glucosa (25 mM). La placa se incuba a 37°C durante 2 horas. Al final de la incubación durante 2 horas, el sobrenadante se transfiere suavemente a una placa de filtro Millipore y se centrifuga a 200 g (fuerza gravitacional) durante 3 minutos. La insulina se ensaya usando un kit de estimación Mercodia Insulin. La adición del Ejemplo 1 a 0,01, 0,1, 1,0, y 10,0 µM más glucosa 25 mM a las células Min6 resultó en un incremento dependiente de la dosis en la secreción de insulina con un incremento estadísticamente significativo (P < 0,01)
15 (2,68 veces en comparación con la conseguida con glucosa 25 mM) a la dosis de 1,0 µM.

Se usan también ensayos de GDIS usando isletas pancreáticas de Langerhans de roedor primario para caracterizar el compuesto ejemplificado. Las isletas pancreáticas se aíslan de ratas SD (Sprague Dawley) macho mediante digestión de colagenasa y separación en gradiente de densidad Histopaque. Las isletas se cultivan durante la noche en medio RPMI-1640 con GlutaMAXn (forma dipeptídica estabilizada de L-glutamina (Nº catálogo Invitrogen 61870-010)) para facilitar la
20 recuperación desde el procedimiento de aislamiento. La secreción de insulina se determina mediante una incubación de 90 minutos en tampón EBSS (Solución salina balanceada de Earle) en una placa de 48 pocillos. Brevemente, en primer lugar, las isletas se pre-incuban en EBSS con glucosa 2,8 mM durante 30 minutos y, a continuación, se transfieren a una placa de 48 pocillos (cuatro isletas/pocillo) que contiene 150 µl de glucosa 2,9 mM, y se incuban con 150 µl de EBSS con glucosa 2,8 u 11,2 mM en presencia o ausencia del compuesto de ensayo durante 90 minutos. El tampón se elimina de
25 los pocillos al final de la incubación, y se ensaya para determinar los niveles de insulina usando el kit Rat Insulin ELISA (Mercodia). En este sistema de ensayo, la incubación del Ejemplo 1 a 1, 3, y 10 µM con isletas de rata y glucosa 11,2 mM resulta en un incremento estadísticamente significativo (P < 0,05) en insulina a 3,0 uM (2,1 veces) en comparación el conseguido con glucosa 11,2 mM. De esta manera, el compuesto de Ejemplo 1 induce producción de insulina bajo las condiciones de este ensayo.

30 **Ensayos de selectividad:**

Ensayos funcionales y de enlace a receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR) α, δ y γ:

Debido a que se conoce que el GPR40 es activado por ligandos a PPARγ el compuesto ejemplificado se examina en ensayos funcionales y de enlace a PPARα, PPARδ y PPARγ, para determinar la selectividad del compuesto del Ejemplo 1 para GPR40. El compuesto del Ejemplo 1 se ensaya esencialmente tal como se describe a continuación para el enlace a
35 PPAR y exhibe valores de enlace mayores de 1000 nM con concentraciones de 10 µM del compuesto de ensayo y, de esta manera, se considera negativo para actividad PPAR.

Las afinidades de enlace del compuesto para los receptores δ, α, y γ, se valoran usando tecnología de ensayo de proximidad de centelleo (SPA). Se usó Repetición Directa 2 (DR2) de oligonucleótido biotinilado para enlazar los receptores a perlas de SPA revestidas con estreptavidina y silicato de itrio. Los receptores de PPAR α, δ y γ y el receptor X retinoide α (RXR) son sobre-expresados en células HEK293, y los lisados celulares que contienen los receptores específicos se usan en los ensayos individuales. El DR2 se une a las perlas SPA durante un periodo de 30 minutos en un tampón de enlace que contiene HEPES 10 mM a pH 7,8, KCl 80 mM, MgCl₂ 0,5 mM, DTT 1 mM, 0,5% de ácido 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]- propansulfónico (CHAPS), y 4,4% de suero bovino. Los lisados celulares se incuban en cada pocillo con una de entre 11 concentraciones del compuesto en presencia de un compuesto de referencia de agonista dual de PPAR α/δ radio-marcado (~0,033,8 µCi ³H) (ácido butanoico, 2-[4-[2-[[[(2,4-difluorofenilamino)carbonil] heptilamino]etilfenoxi]-2- metilo, véase Burris T.P. et al. Molecular Pharmacology 2005, 67, (3) 948-954) para los ensayos del receptor alfa y delta y un compuesto de referencia agonista de PPARγ radio-marcado (~0,037,3 µCi ³H) (ácido propanoico, 2-metil-2-[4-[3-[propil[5-(2-piridinil)-2- tienil]sulfonil]amino]propil]fenoxi] véase Burris T.P. et al. Molecular Pharmacology 2005, 67, (3) 948-954) para los ensayos del receptor gama, 110,3 µg de perlas SPA revestidas con e
45 estreptavidina e itrio, HD Oligo DR2 0,126 nM, y 0,3 µg de PPARα con 0,5 µg de RXRα, 0,5 µg de PPARδ con 0,5 µg RXRα, o 1,25 µg de PPARγ con 3,03 µg de RXRα en el tampón de enlace anterior más 14% de glicerol y 5 µg 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 PPARα/δ no marcado para los ensayos del receptor alfa y delta y el compuesto de referencia del agonista PPARγ para el ensayo del receptor gama. La reacción de unión (100 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos [Costar 3632]) se incuban durante 10 horas y se cuentan las desintegraciones por minutos (dpm) en un dispositivo Wallac Microbeta. La afinidad de unión al receptor (IC₅₀) para el compuesto se determina ajustando una curva de respuesta de concentración de 11 puntos con una ecuación logística de 4 parámetros. K_i se determina a partir de IC₅₀ usando la
50

ecuación Cheng-Prusoff y K_d se determina mediante unión de saturación. Para el compuesto del Ejemplo 1, no se detecta unión en ninguno de los tres ensayos de unión a PPAR con concentraciones de hasta 10 μM . De esta manera, los ensayos expuestos en la presente memoria apoyan la tesis de que el compuesto del Ejemplo 1 activa selectivamente GPR40 mientras evita la actividad PPAR indeseada. Los valores IC_{50} relativos para el compuesto ejemplificado cuando se ensayan hasta 30 μM son mayores de 10 μM para las isoformas de PPAR, apoyando la tesis de que el compuesto ejemplificado evita la actividad de PPAR mientras proporciona la activación de GPR40 deseada.

Los ensayos funcionales del indicador Gal4 PPAR α , Gal4 PPAR δ y PPAR γ se usan también para supervisar la selectividad del compuesto ejemplificado. Células CV1, las cuales se derivan a partir del tejido renal de mono verde africano, se transfectan con varios plásmidos de receptor e indicador usando Fugene. Para los ensayos Gal4 PPAR α y PPAR δ , un plásmido indicador que contiene cinco copias aleatorias del elemento de respuesta Gal4 de la proteína de transcripción de levadura, clonado aguas arriba de un gen de luciferasa de libélula accionado por el promotor tardío principal de adenovirus, se transfecta junto con un plásmido accionado por virus de simio 40 (SV40) que expresa constitutivamente una proteína híbrida que contiene el dominio de unión a ADN Gal4 (DBD), y la unión de ligando PPAR α o PPAR δ . Para el ensayo PPAR γ , los plásmidos que codifican para PPAR γ y RXR α , ambos accionados por un promotor de citomegalovirus (CMV), se transfectan junto con un plásmido que contiene ADNc indicador de luciferasa accionado por el promotor TK y un elemento de respuesta del receptor (2X PPRE). Las células se transfectan en matraces de cultivo celular de T225 cm^2 en medio DMEM con FBS tratado con carbono activado al 5%. Después de una noche de incubación, las células transfectadas son tripsinizadas; se colocan en discos opacos de 96 pocillos (15.000 células/pocillo) en medio DMEM que contiene FBS tratado con carbón activado al 5%, incubado durante 4 horas; y expuesto a entre 0,17 ηM y 10 μM de compuesto de ensayo o de referencia en diluciones semi-logarítmicas. Después de 24 horas de incubación con el compuesto, las células se someten a lisis y la actividad de luciferasa se determina como una medida de la activación de receptor por luminiscencia. Los datos se ajustan a un modelo logístico de ajuste de cuatro parámetros para determinar los valores EC_{50} . El máximo porcentaje de estimulación se determina en función de la estimulación máxima obtenida con 10 μM de un compuesto de referencia de agonista PPAR apropiado. No se detectó activación funcional de PPAR α , PPAR δ , o PPAR γ con el compuesto del Ejemplo 1 cuando se examinó hasta 10 μM en los ensayos funcionales/co-transfección (CTF) de PPAR específicos descritos anteriormente. De esta manera, el ensayo apoya la tesis de que el compuesto ejemplificado evita la actividad agonista de PPAR, tal como se desea.

Eficacia in vivo: Ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

Para examinar la capacidad del compuesto ejemplificado para activar GPR40 in vivo, resultando en una eficacia anti-diabética, es decir, reducción de los niveles de glucosa en plasma, se completó un estudio de ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT) de 4 días, y a continuación los datos se muestran para el compuesto ensayado.

Ratones macho Balb/c (ratones albinos) (8-9 semanas de edad) son alojados individualmente, y alimentados con dieta de comida normal de roedor y agua *ad libitum*. Los animales se pesan; se aleatorizan por peso corporal; y sus pesos corporales diarios se registran. Los animales se dosifican una vez por día oralmente durante tres días usando una formulación con metilcelulosa y tween-80. La noche anterior al Día 4, los animales son sometidos a ayuno durante la noche. La mañana del Día 4, los animales se dosifican oralmente con el compuesto o solo vehículo, 60 minutos antes del ensayo de tolerancia a la glucosa (glucosa 2 g/kg, i.p.). Los niveles de glucosa en sangre se determinan a partir de sangrados de la cola tomados en los minutos 0, 3, 7, 15, 30 y 60 después de la estimulación con glucosa. El perfil de excursión de glucosa en sangre desde $t=0$ hasta $t=60$ minutos se usa para integrar un área bajo la curva (AUC) para cada tratamiento. El porcentaje de reducción en glucosa se calcula a partir de los datos AUC del compuesto con respecto al AUC del grupo de vehículo. El compuesto de ensayo se administra oralmente a 0,3, 1,0, 3,0, 10 o 30 mg/kg, y un control positivo de ácido (3-[4-(2-metil-benciloxi)-fenil]-hex-4-inoico, véase W02005086661) se administra a 10 mg/kg. Los niveles de glucosa se reducen significativamente en comparación con los conseguidos con el control de vehículo en los puntos de tiempo de 15 minutos con las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg y en los puntos de tiempo de 30 y 60 minutos con las dosis de 1,0, 3,0, 10 y 30 mg/kg del Ejemplo 1. Los niveles de glucosa se reducen en los puntos de tiempo de 15, 30 y 60 minutos para el control positivo. El ED_{50} para este compuesto basado en las AUCs para la reducción de glucosa es de 1,0 mg/kg. Los resultados de este estudio demuestran que la activación de GPR40 por el Ejemplo 1 conduce a una eficacia anti-diabética *in vivo*.

El compuesto ejemplificado de la presente invención puede ser formulado fácilmente en composiciones farmacéuticas según las prácticas aceptadas conocidas en la técnica, tales como las que pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences", Gennaro, Ed., Mack Publishing Co. Easton Pa. 1990, tales como comprimidos, cápsulas sólidas o rellenas de gel, polvos, suspensiones o soluciones. La composición puede incluir también uno o más vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos de vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para dichas formulaciones incluyen los siguientes: almidón, azúcares, manitol, y derivados de sílice; agentes aglutinantes tales como carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina y polivinil-pirrolidona; agentes humectantes tales como glicerol; agentes desintegrantes tales como carbonato de calcio y bicarbonato de sodio; agentes para retardar la disolución tales como parafina; aceleradores de la resorción tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes tensioactivos tales como alcohol cetílico,

monoestearato de glicerol; vehículos adsorptivos tales como caolín y bentonita; y lubricantes tales como talco, calcio y estearato de magnesio y polietilenglicoles sólidos.

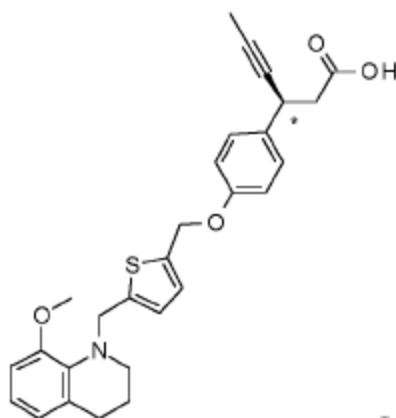
5 Las composiciones farmacéuticas preferentes incluyen las formuladas como un comprimido o una cápsula para su administración oral. El comprimido o la cápsula puede incluir un compuesto de la presente invención en una cantidad efectiva para tratar la diabetes, particularmente diabetes de tipo dos.

La formulación farmacéutica se administra a un paciente en cantidades efectivas para tratar la diabetes, más particularmente, diabetes de tipo dos. Una cantidad apropiada o dosis efectiva para tratar un paciente puede ser determinada por un profesional de la salud.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es:

5



I ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el asterisco (*) identifica un carbono quiral.

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos uno de entre un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

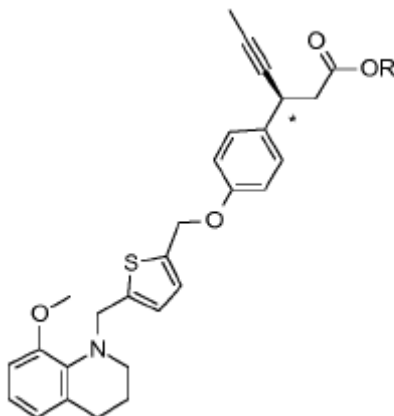
15

3. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en terapia.

4. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la diabetes en un mamífero.

5. Un compuesto según la Fórmula II

20



II

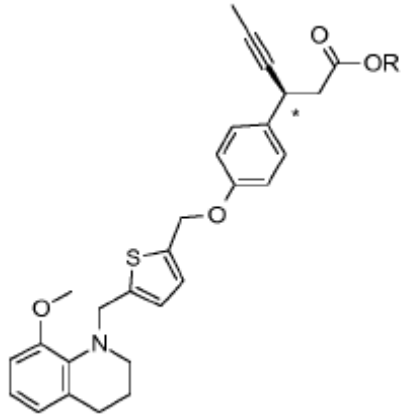
en la que R se selecciona de entre alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, cicloalquilo C₃₋₆, alquilo C₁₋₄-cicloalquilo C₃₋₆, fenilo y alquilfenilo C₁₋₅, en la que el asterisco (*) identifica un carbono quiral.

30

6. Un procedimiento de preparación de ácido (3S)-3-[4-[[5-[[8-metoxi-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-il]metil]-2-tienil]metoxi]fenil]hex-4-inoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo dicho procedimiento des-esterificar un compuesto de Fórmula II;

35

5



II

10

en la que R se selecciona de entre alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, cicloalquilo C₃₋₆, alquilo C₁₋₄-cicloalquilo C₃₋₆, fenilo y alquilfenilo C₁₋₅ para proporcionar un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.