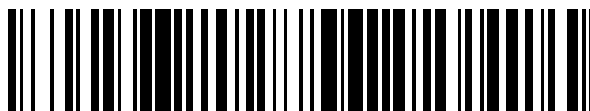


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 825**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/357** (2006.01)

**C07D 319/06** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2008 PCT/US2008/051521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008 WO08089461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008 E 08727968 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2150111**

54 Título: **1,3-Dioxanos sustituidos útiles como moduladores de PPAR**

30 Prioridad:

**18.01.2007 WO PCT/IB2007/002542**

**21.11.2007 US 989808 P**

**21.11.2007 US 989806 P**

**21.11.2007 US 989805 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.04.2017**

73 Titular/es:

**EVOLVA SA (100.0%)  
DUGGINGERSTRASSE 23  
4153 REINACH, CH**

72 Inventor/es:

**SORENSEN, ALEXANDRA SANTANA;  
MEYER, JEAN-PHILIPPE;  
ALBERTS, PETERIS;  
PRATHAMA, MAINKAR S. y  
CRAMERI, MELYA HUGHES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 609 825 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

1,3-Dioxanos sustituidos útiles como moduladores de PPAR

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a un grupo específico de 2,4-difenil-1,3-dioxanos capaces de modular la actividad de PPAR (también denominados en este documento como "moduladores de PPAR"). Los 1,3-dioxanos sustituidos de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de complicaciones de la diabetes en un paciente que padece resistencia a la insulina y/o diabetes. Los dioxanos de la invención también son útiles en la modulación, en particular para antagonizar, la actividad del receptor de tromboxano (receptor del prostanoide tromboxano, es decir, el receptor TP) y/o la inhibición de la tromboxano sintasa. El receptor de tromboxano, el receptor A2 de tromboxano o el receptor H2 de prostaglandina se denominan cada uno aquí como "receptor TP" de acuerdo con la convención estipulada en el compendio de la IUPHAR de caracterización y clasificación de receptores de 1998, página 239, y el Manual Sigma-RBI 5ª edición, "Prostanoid receptors", 2006, páginas 138-140. Los compuestos para uso en la invención también se denominan como moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP e inhibidores de la tromboxano sintasa (TS).

20 **Antecedentes de la invención**

Los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR) son receptores de hormonas nucleares. Los receptores PPAR activan la transcripción mediante la unión a elementos de secuencias de ADN, conocidos como elementos de respuesta de proliferadores de peroxisomas (PPRE), en forma de un heterodímero con los receptores de retinoides X (conocidos como RXR). Se han identificado y descrito tres subtipos de PPAR humanos: PPAR-alfa, PPAR-gamma y PPAR-delta (o NUCI). PPAR-alfa se expresa principalmente en el hígado, mientras que PPAR-delta es ubicuo. PPAR-gamma está implicado en la regulación de la diferenciación de los adipocitos, donde se expresa en gran medida. También tiene un papel clave en la homeostasis lipídica sistémica. Se han identificado una serie de compuestos que modulan la actividad de los PPAR incluyendo tiazolidindionas, que se han empleado en el tratamiento de diabetes.

Las secuencias de ADN de los subtipos de PPAR-gamma se describen en Elbrecht et al, BBRC 224.; 431-437 (1996). Los proliferadores de peroxisomas, incluyendo los fibratos y ácidos grasos, activan la actividad transcripcional de los PPAR.

Se proporcionan numerosos ejemplos en la bibliografía que ilustran que los PPAR están estrechamente implicados en una amplia gama de enfermedades o afecciones patológicas que están asociadas con las células que expresan estos receptores nucleares. Más específicamente, los PPAR son útiles como diana de fármaco en procedimientos para reducir la glucosa en sangre y los niveles de colesterol y triglicéridos, y por consiguiente se exploran para el tratamiento y/o profilaxis de resistencia a la insulina, dislipidemia y otros trastornos relacionados con el síndrome X (también designado "el síndrome metabólico") (documentos WO 97/25042, WO 97/10813, WO 97/28149; véase también Kaplan et al, 2001, J Cardiovasc Risk, 8, 211-7), incluyendo la obesidad y la aterosclerosis (Duez et al, 2001, J. Cardiovasc. Risk, 8, 185-186), enfermedad arterial coronaria y ciertos otros trastornos cardiovasculares. Además, se ha mostrado que los PPAR son dianas potenciales para el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias tales como trastornos cutáneos (véase Smith et al., 2001, J. Cutan. Med. Surg., 5, 231-43), enfermedades gastrointestinales (documento WO 98/43081) o enfermedades renales, incluyendo glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, síndrome nefrótico y nefroesclerosis hipertensiva. Del mismo modo, los PPAR son útiles para mejorar las funciones cognitivas en enfermedades neurológicas (Landreth y Heneka, 2001, Neurobiol Aging, 22,937-44) o en demencia, para tratar psoriasis, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) o para prevenir y tratar la pérdida de hueso, por ejemplo, osteoporosis (véanse por ejemplo los documentos US 5.981.586 o US 6.291.496).

Por tanto, los PPAR son dianas interesantes para el desarrollo de compuestos terapéuticos. Aunque las respuestas observadas en el contexto de los diferentes procedimientos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o afecciones patológicas son alentadoras, por ejemplo, la clase de medicamentos de tiazolidindiona, TZD, (p. ej., rosiglitazona o pioglitazona) desempeña sin ambigüedad un papel crítico en la mejora de la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes de tipo 2 (véase Cheng lai y Levine, 2000, Heart Dis., 2, 326-333), no son tratamientos totalmente satisfactorios debido a la aparición de numerosos efectos secundarios no deseados graves (por ejemplo, ganancia de peso, hipertensión, hipertrofia cardíaca, hemodilución, toxicidad hepática y edema; véanse Haskins et al, 2001, Arch Toxicol, 75,425-438; Yamamoto et al, 2001, Life Sci., 70, 471-482; Scheen, 2001, Diabetes Metab, 27,305-313; Gale, 2001, Lancet, 357, 1870-1875; Forman et al, 2000, Ann. Intern. Med., 132, 118-121 y Al Salman et al., 2000, Ann. Intern. Med., 132, 121-124). En consecuencia, es deseable identificar productos mejorados novedosos y/o procedimientos novedosos que permitan el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o afecciones patológicas asociadas con los tipos de células que expresan los receptores nucleares PPAR. Más específicamente, la mayoría de los efectos secundarios observados con derivados de TZD son atribuibles a las propiedades de agonista completo de dichos compuestos y por tanto es deseable identificar nuevos compuestos que no sean necesariamente agonistas completos.

El receptor de tromboxano está implicado en la agregación de plaquetas de la sangre y se ha implicado en la vasoconstricción, así como en la constricción del músculo liso bronquial y traqueal.

5 La solicitud de patente europea, publicación nº. 94239; la solicitud de patente europea, publicación nº 0.266.980 y el documento USPN 4.895.962 nombran ciertos derivados de ácido 4-fenil-1,3-dioxan-5-ilalquenoico y describen su utilidad potencial como antagonistas del receptor de tromboxano. Se necesitan compuestos adicionales para la modulación de los receptores de tromboxano y/o receptores activado por peroxisomas (PPAR) y para el tratamiento y la prevención de enfermedades asociadas con ellos.

10 El documento EP 0094239 A2 da a conocer ácidos 1,3-dioxan-5-ilalquenoicos y que estos compuestos antagonizan una o más de las acciones del tromboxano A2. Los trastornos mencionados específicamente son hipertensión y asma bronquial.

15 El documento EP 0.329.360 A2 da a conocer derivados de 4-piridil-1,3-dioxano y su uso para el tratamiento de enfermedades como asma, enfermedades inflamatorias e hipertensión.

El documento WO 00/30683 da a conocer una variedad de compuestos que incluyen ciertos ácidos alquenoicos y 1,3-dioxanos como antagonistas de TXA<sub>2</sub> para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

20 Brown et al. Bioorg. & Med. Chem. Lett., (1996) vol. 3, pág. 273-278 da a conocer derivados de ácido 2-fenil-1,3-dioxanoalquenoico que tienen actividad dual como antagonistas de TXA<sub>2</sub>-inhibidores de tromboxano sintetasa.

25 Brewster et al. Prostaglandins, 1988, vol. 36(2), pág. 173-178 da a conocer la síntesis de un compuesto identificado como ICI 192605 e indica que el compuesto es un antagonista del receptor de tromboxano.

Brewster et al., J. Med. Chem., vol. 30, 1987, páginas 67-70 da a conocer ácido (5Z)-7-(2,2-dimetil-4-fenil-1,3-dioxan-cis-5-il)heptenoico e indica que el compuesto es un antagonista del receptor de tromboxano A2.

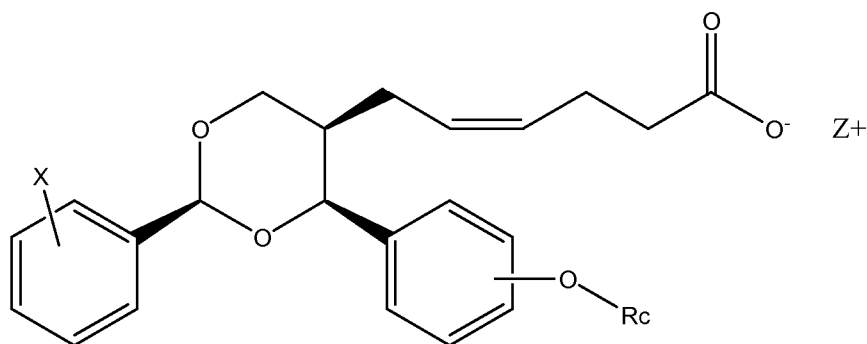
30 Brown et al., J. Pharm. Pharmacol., vol. 38, nº 9, 1986, páginas 706-708, da a conocer la síntesis de un ácido 1,3-dioxano-5-alquenoico e indica que el compuesto es un antagonista del receptor de tromboxano.

35 Hall, Med. Res. Rev. , 1991, vol. 11(5), pág. 503-579 discute diversos derivados de 1,3-dioxano incluyendo ICI 159.995, ICI 180.080, ICI 185.282 e ICI 192.605, y otros compuestos que se dice que son antagonistas del receptor de TXA<sub>2</sub>.

### Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a compuestos capaces de modular la actividad de uno o más de PPAR (en particular gamma PPAR), receptor TP y tromboxano sintasa (TS), preferiblemente de los tres. Además, la invención se refiere a diversos usos de estos compuestos en el tratamiento de una serie de afecciones clínicas especificadas en este documento a continuación.

45 En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto cristalino de fórmula XIV:



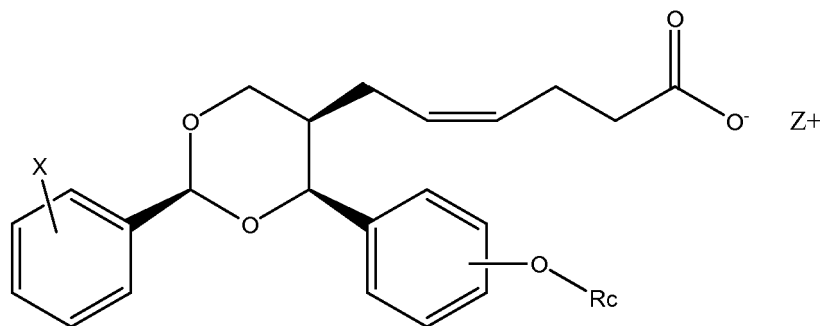
Fórmula XIV

50 en la que X se selecciona de fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo opcionalmente sustituido, ciano, metoxi y nitro; y

Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -CH(O), un sacárido o -H; y Z<sup>+</sup> es Me<sub>3</sub>CNH<sub>3</sub><sup>+</sup>

para uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones de la diabetes en un paciente que padece resistencia a la insulina y/o diabetes, donde las complicaciones de la diabetes se seleccionan del grupo que consiste en complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos; nefropatía diabética o retinopatía diabética; trastornos en la sensibilidad a la insulina después de traumatismo, cirugía o infarto de miocardio; síndrome metabólico, hiperinsulinemia, dislipidemia, tolerancia reducida a la glucosa; riesgo de desarrollar trastornos cardiovasculares y/o diabetes mellitus de tipo II; aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia o dislipidemia; daño a los vasos sanguíneos y los riñones y daño renal.

Además, la invención se refiere a un solvato cristalino que comprende un compuesto de fórmula XIV:



Fórmula XIV

en la que X se selecciona de fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo opcionalmente sustituido, ciano, metoxi y nitro; y

Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -CH(O), un sacárido o -H;

Z<sup>+</sup> es una *tert*-butilamina; y

un disolvente seleccionado del grupo que consiste en *tert*-butilmetiléter, alcohol isopropílico, nitrometano y combinaciones de los mismos;

para uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones de la diabetes en un paciente que padece resistencia a la insulina y/o diabetes, donde las complicaciones de la diabetes se seleccionan del grupo que consiste en complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos; nefropatía diabética o retinopatía diabética; trastornos en la sensibilidad a la insulina después de traumatismo, cirugía o infarto de miocardio; síndrome metabólico, hiperinsulinemia, dislipidemia, tolerancia reducida a la glucosa; riesgo de desarrollar trastornos cardiovasculares y/o diabetes mellitus de tipo II; aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia o dislipidemia; daño a los vasos sanguíneos y los riñones y daño renal.

La invención se refiere además a un compuesto que comprende una sal cristalina o solvato de sal de *tert*-butilamina del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.

Estos compuestos de acuerdo con la invención pueden por ejemplo ser útiles en el tratamiento o la prevención de una afección clínica seleccionada del grupo que consiste en síndrome metabólico, obesidad, resistencia a la insulina, prediabetes, diabetes, dislipidemia, enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis atópica, asma y colitis ulcerosa, cánceres tales como liposarcoma, neuroblastoma, de vejiga, mama, colon, pulmón, páncreas y próstata; inflamación, infecciones, SIDA y la curación de heridas.

Además, estos compuestos según la invención pueden por ejemplo ser útiles en el tratamiento o la prevención de una afección clínica que se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio, trombosis, trastornos trombóticos, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, nefropatía diabética, retinopatía, enfermedad arterial periférica, menor circulación en las extremidades, embolia pulmonar, formación de trombos, formación de trombos desencadenada por prótesis endovasculares, reestenosis inducida por prótesis endovasculares, hiperplasia, hiperplasia desencadenada por prótesis endovasculares, choque séptico, preeclampsia, asma, rinitis, rinitis alérgica, angiogénesis y metástasis tumorales.

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra un modelo de activación de PPAR por un agonista completo y un agonista parcial, respectivamente.

La figura 2 ilustra la activación selectiva de PPAR-gamma por rosiglitazona y ácido (Z)-6 -(2-(2-clorofenil)-4-(2-

hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, en comparación con PPAR-delta, PPAR-alfa y RxR.

La Figura 3 ilustra la activación de PPAR-gamma completo por rosiglitazona y ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico.

La Figura 4 ilustra que el ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico no tiene efecto sobre la transactivación de PPAR-delta completo.

La Figura 5 ilustra los resultados de los ensayos de competición de PPAR-gamma parcial.

La Figura 6 ilustra los resultados de los ensayos de desplazamiento de ligando de PPAR-gamma.

La Figura 7 ilustra los resultados de los ensayos de captación de glucosa.

La Figura 8 ilustra las fórmulas químicas IV y V.

La Figura 9 ilustra las fórmulas químicas VI-VIII.

La figura 10 ilustra el esquema de reacción química I.

La Figura 11 ilustra la <sup>1</sup>H-RMN del solvato de TBME de ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.

La Figura 12 ilustra el difractograma de XRPD del solvato de TBME de ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico .

La Figura 13 ilustra la <sup>1</sup>H-RMN de la sal de erbumina del ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico .

La Figura 14 ilustra el difractograma de XRPD de la sal de erbumina del ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.

La Figura 15 ilustra el difractograma de XRPD del solvato de IPA de la sal de erbumina del ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

En general, los términos utilizados en este documento tendrán sus definiciones estándares que un experto ordinario en las técnicas farmacéuticas, biológicas y químicas emplearía en la comprensión de la invención. Los siguientes términos tienen los significados dados, y pueden proporcionarse en las especificaciones otros términos.

Alquilo: El término "alquilo" hace referencia a un radical hidrocarburo alifático saturado monovalente que tiene el número indicado de átomos de carbono, generalmente de uno a veintidós. Por ejemplo, un "alquilo C1-8" o un "alquilo de 1-8 átomos de carbono" o "alq 1-8" haría referencia a cualquier grupo alquilo que contuviera de uno a ocho carbonos en la estructura. Alquilo puede ser una cadena lineal (es decir, lineal) o una cadena ramificada. Los ejemplos representativos de radicales alquilo inferiores incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, isopropilo, isobutilo, isopentilo, amilo, sec-butilo, terc-butilo, sec-amilo, terc-pentilo, 2 -etilbutilo, 2,3-dimetilbutilo y similares. Alquilo superior hace referencia a alquilos de siete átomos de carbono y más. Estos incluyen n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, n-eicosilo y similares, junto con las variaciones ramificadas de los mismos. Una cadena de carbonos lineal de 3 a 7 carbonos haría referencia a la longitud de la cadena, sin incluir los átomos de carbono que residen en una ramificación. El radical puede estar opcionalmente sustituido.

Alcoxi: El término "alcoxi" hace referencia a un radical monovalente de la fórmula RO-, en donde R es un alquilo como se define en este documento. Alcoxi inferior hace referencia a un alcoxi de 1-6 átomos de carbono o alcoxi (1-6). Los radicales alcoxi inferiores incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, n-butoxi, n-pentiloxi, n-hexiloxi, isopropoxi, isobutoxi, isopentiloxi, amiloxi, sec-bu-Toxy, terc-butoxi, terc-pentiloxi, y similares. El alcoxi puede estar adicionalmente sustituido.

Halógeno: Un sustituyente "halógeno" es un radical halógeno monovalente seleccionado entre cloro, bromo, yodo, y fluoro. Un compuesto "halogenado" es aquel sustituido con uno o más sustituyentes halógeno.

Fenilo: Un "fenilo" es un radical formado por la retirada de un hidrógeno de un anillo de benceno. El fenilo puede

estar adicionalmente sustituido.

Opcionalmente sustituido: Si se hace referencia a un radical como "opcionalmente sustituido", significa que el radical está sin sustituir o se retira al menos un -H del radical y se inserta en su lugar otro sustituyente. El radical puede estar opcionalmente sustituido con sustituyentes en posiciones que no interfieran significativamente con la preparación de compuestos que entran dentro del alcance de esta invención y que no afecten de manera significativamente adversa a la actividad biológica de los compuestos. El radical está opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, alcoxi inferior, hidroxilo, ciano, nitro, amino, halogenoalquilo inferior, halogenoalcoxi inferior, hidroxicarbonilo, alcoxicarbonilo inferior, alquilcarboniloxi inferior y alquilcarbonilamino inferior, o como se hace referencia anteriormente en este documento.

El término "hidroxicarbonilo" es un radical monovalente que tiene la fórmula  $-C(O)OH$ .

El término "alcoxicarbonilo inferior" es un radical monovalente con la fórmula  $-C(O)OAlq$ , donde Alq es alquilo inferior.

El término "alquilcarboxiloxi inferior" es un radical monovalente con la fórmula  $-OC(O)Alq$ , donde Alq es alquilo inferior.

Como se usa en este documento, los términos "un azúcar" o "un sacárido" se utilizan indistintamente y significan un monosacárido, un disacárido o un polisacárido. Los monosacáridos adecuados incluyen residuos de pentosa, hexosa, o heptosa. Los ejemplos no limitantes de pentosas incluyen arabinosa, ribosa, ribulosa, xilosa, lixosa y xilulosa. Los ejemplos no limitantes de hexosas incluyen glucosa, galactosa, fructosa, fucosa, manosa, alosa, altrosa, talosa, idosa, psicosa, sorbosa, ramnosa y tagatosa. Los ejemplos no limitantes de heptosas incluyen manoheptulosa y sedoheptulosa. Un resto de azúcar puede estar ligado con el compuesto en cualquier posición del anillo de azúcar que pueda formar un enlace amida o éster. Los sacáridos preferidos son beta-glicosil-sacáridos.

La modulación de PPAR se define por referencia a la situación natural, concretamente, el nivel basal de transcripción dependiente de PPAR de los genes diana en ausencia de ligandos, en la que la modulación de la actividad de PPAR se refleja por una disminución o aumento de dicho nivel basal de transcripción en presencia de un compuesto capaz de modular la actividad de PPAR. En general, un aumento de dicha transcripción se asocia con una mejora de la actividad de PPAR y se refiere a compuestos llamados activadores o agonistas. A la inversa, una disminución de dicha transcripción se asocia con una inhibición de la actividad de PPAR y se refiere a compuestos llamados inhibidores o antagonistas. Los agonistas parciales son compuestos que dan lugar a la transcripción dependiente de PPAR de un subconjunto de los genes diana, mientras que no tiene efecto sobre otros genes diana de PPAR. Los agonistas parciales pueden ser vistos desde un punto de vista bioquímico o fisiológico. El punto de vista bioquímico de un agonista parcial es un compuesto que puede competir con un agonista completo y que tiene un menor nivel de transactivación respecto a un agonista completo. El punto de vista fisiológico de un agonista parcial se refiere a la activación de diferentes subconjuntos de genes (incluso la activación completa de algunos genes diana y la no activación de otros genes diana de PPAR). Esto da lugar a solamente algunos de los efectos fisiológicos de un agonista completo, lo que es altamente deseable.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto en necesidad del mismo, producirá el resultado deseado con el tiempo para la afección a tratar. Por ejemplo, el efecto deseado puede ser la modulación de PPAR y la actividad biológica asociada con la misma.

Los compuestos útiles en esta invención se representan por diversas fórmulas en esta solicitud. Al ver las fórmulas, será evidente que los compuestos a menudo tendrán uno o más centros quirales, concretamente, un carbono al que están unidos cuatro grupos diferentes, y estos pueden existir como enantiómeros y diastereómeros. Además, debido a la presencia en algunos casos de dobles enlaces, un compuesto tendrá la rotación impedida. Así, el compuesto exhibe isomería geométrica, concretamente, dos formas pueden diferir entre sí en la forma en que los átomos están orientados en el espacio. Con respecto a los dobles enlaces, existen estereoisómeros a los que se hace referencia como diastereómeros. Los diastereómeros (o diastereoisómeros) son estereoisómeros que no son enantiómeros (imágenes especulares entre sí). Al nombrar los compuestos en esta solicitud, se utiliza el sistema del Chemical Abstracts Service en el que a los dos grupos enlazados a cada extremo del enlace doble se les proporciona un número de prioridad como se hace al nombrar los enantiómeros en el sistema R, S. Cuando dos grupos del número de prioridad más alto están en el mismo lado, la molécula es el isómero Z. (*Zusammen* en alemán, juntos). La molécula es E cuando están en lados opuestos (*entgegen*, en alemán opuesto). Debe entenderse que las fórmulas están destinadas a englobar todos los posibles enantiómeros y diastereómeros, ya sea solos o en mezcla. Debe entenderse que las fórmulas que indican una estereoquímica específica abarcan sólo el estereoisómero específico mostrado.

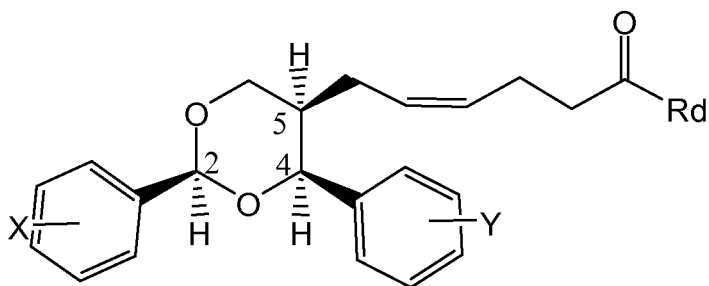
### Compuestos útiles en la invención

La invención se basa en parte en la identificación de compuestos que son capaces de modular la actividad de al menos un subtipo de PPAR, por ejemplo PPAR gamma o PPAR beta/delta. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de afecciones o enfermedades en mamíferos, tales como seres humanos, mediadas por la función de dichos PPAR. En otra realización, los compuestos de la invención son capaces de modular la actividad del receptor TP, en particular antagonizar la actividad del receptor TP. Se hace referencia a los compuestos de la invención que exhiben tanto modulación de PPAR como modulación del receptor TP "moduladores de PPAR/receptor TP". En una realización adicional, los compuestos de la invención son capaces de inhibir la tromboxano sintasa (TS). Los compuestos que exhiben dos o tres de estas actividades son particularmente deseables para algunas aplicaciones, por ejemplo y sin limitación, el tratamiento de complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos.

Los compuestos que son útiles en esta invención son derivados de 1,3-dioxano definidos en las reivindicaciones adjuntas. Cuando se haga referencia en la presente memoria a cualquier compuesto para su uso en la invención, se entenderá que este se proporciona en la forma de la sal de terc- butilamina de acuerdo con las reivindicaciones.

A menos que sea de otra manera evidente por el contexto, las fórmulas químicas a las que se hace referencia en este documento pueden mostrarse en una configuración particular, pero esta no se corresponde necesariamente con la configuración absoluta.

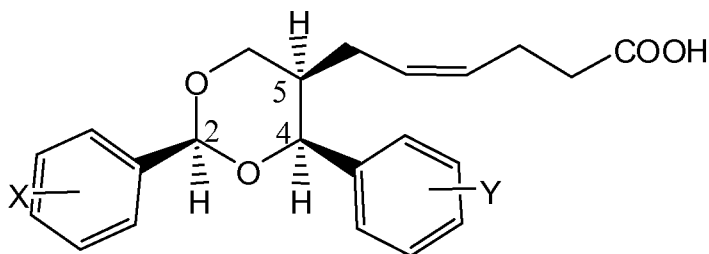
Son moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para su uso según la presente invención las sales de terc- butilamina de los compuestos de fórmula XI:



Fórmula XI

en la que X se puede seleccionar del grupo que consiste en fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo sustituido, ciano, metoxi y nitro, preferiblemente X se selecciona del grupo que consiste en halógeno, más preferiblemente X es cloro, en el que X puede estar en la posición orto, meta y/o para, preferiblemente la posición orto, y en la que Y se puede seleccionar del grupo que consiste en -OH, -O-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal), -OC(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal) y -O-CH(O), más preferiblemente Y se selecciona del grupo que consiste en -OH, metoxi y -OC(O)-CH<sub>3</sub>, en la que Y puede estar en la posición orto, meta y/o para, preferentemente la posición orto, y Rd es -OH.

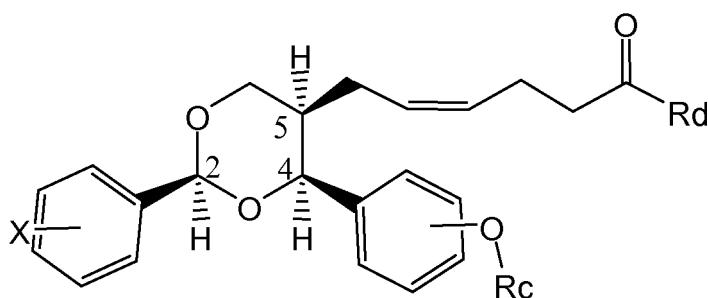
Son moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para su uso en la invención las sales de terc- butilamina de los compuestos de Fórmula XI, en la que Rd es -OH. Estos compuestos tienen la fórmula general XII):



Fórmula XII

en la que X e Y son como se ha indicado anteriormente en este documento para los compuestos de Fórmula XI. La estereoquímica específica de los compuestos de fórmula XII es importante y es como se indica en dicha fórmula.

Son moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para su uso según la presente invención las sales de terc- butilamina de los compuestos de fórmula XIII:



Fórmula XIII

5 en la que X se selecciona de fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo opcionalmente sustituido, ciano, metoxi y nitro, preferiblemente X es halógeno, más preferiblemente X es cloro, en la que X puede estar en la posición orto, meta y/o para, preferiblemente la posición orto, y

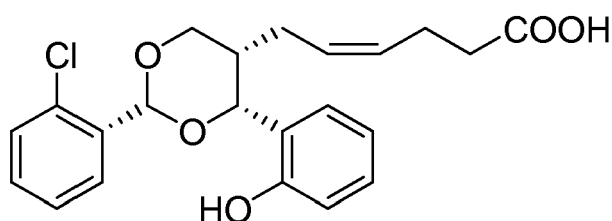
Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal), -CH(O), un sacárido (preferiblemente un mono - o disacárido, más preferiblemente un monosacárido, aún más preferiblemente glicosilo) o -H, preferiblemente Rc es metoxi, -C(O)-CH<sub>3</sub> o -H y Rd es -OH.

10 Otras sustituciones específicas del resto fenilo portador de X que son de particular interés incluyen, por ejemplo, en las que X es 2-fluoro-, 2-cloro-, 2-bromo-, 2-ciano, 2-trifluorometil-, 3-fluoro-, 3-cloro-, 3-ciano, 3-nitro-, 3-metoxi-, 4-cloro-, 4-ciano, 4-nitro- y 4-metoxifenilo.

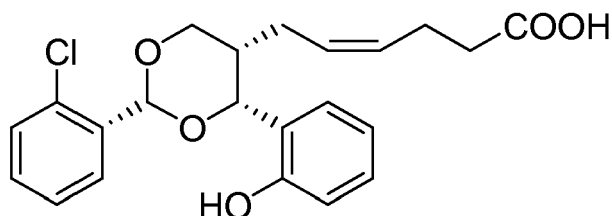
15 La estereoquímica particular de los compuestos de fórmula XIII es importante y es como se indica en dicha fórmula.

Para ilustrar, el ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico tiene doble diastereómeros de doble enlace, *cis* y *trans*. Ambos enantiómeros ensayados en los ejemplos a continuación tienen el doble enlace en la configuración *cis*. Cada uno de los 3 grupos de todo el dioxano pueden estar en una posición *cis* o *trans* relativamente entre sí y da un total de 8 combinaciones posibles, solamente 2 donde los 3 grupos están en la posición *cis*, concretamente, los sustituyentes pueden estar todos arriba o todos abajo.

25 El ácido (Z)-6-((2R, 4R, 5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico tiene los 3 grupos todos abajo

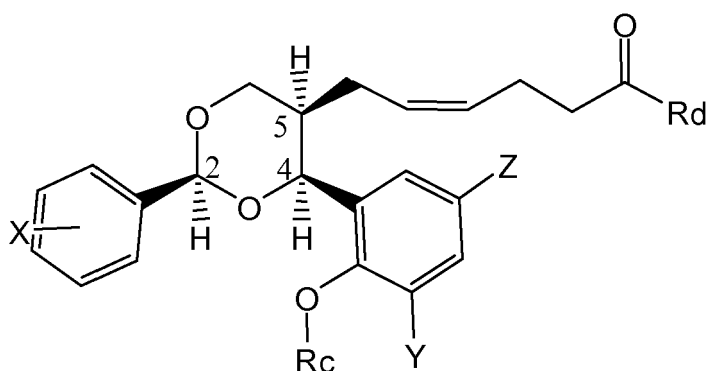


30 El ácido (Z)-6-((2S, 4S, 5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico tiene los 3 grupos todos arriba, lo cual tiene un efecto drástico sobre sus actividades biológicas:



35 En una realización muy preferida, el grupo -O-Rc se coloca en la posición orto. En esta realización, son moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS preferidos las sales de terc- butilamina de los compuestos de fórmula XIV:





5 en la que X, Z e Y son como se especifican en este documento anteriormente, preferiblemente X es halógeno, más preferiblemente X es cloro, en la que X puede estar en la posición orto, meta y/o para, preferiblemente la posición orto, y Z e Y son ambos -H, y

10 Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal, preferiblemente lineal), -CH(O), un sacárido (preferiblemente un mono - o disacárido, más preferiblemente un monosacárido, aún más preferiblemente glicosilo) o -H, preferiblemente Rc es metoxi, -C(O)-CH<sub>3</sub> o -H, y Rd es -OH.

La estereoquímica particular de los compuestos de fórmula XIV es importante y es como se indica en dicha fórmula.

Los compuestos muy preferidos para uso en la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en

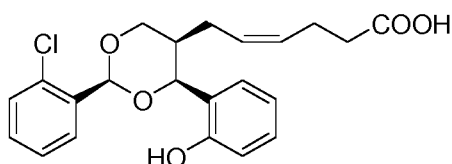
15 ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico,

ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-metoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico,

20 ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-acetoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico y

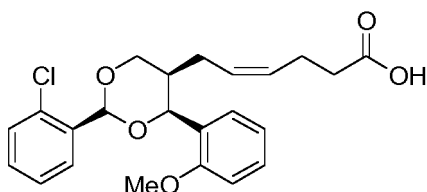
(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoato de metilo.

Por consiguiente, un compuesto preferido para su uso en la invención es un compuesto de la siguiente estructura:



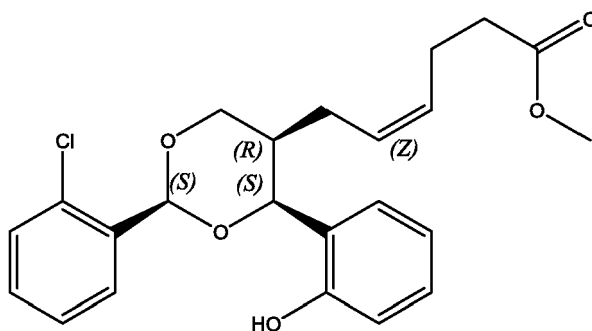
25

Otro compuesto preferido para su uso en la invención es un compuesto de la siguiente estructura:



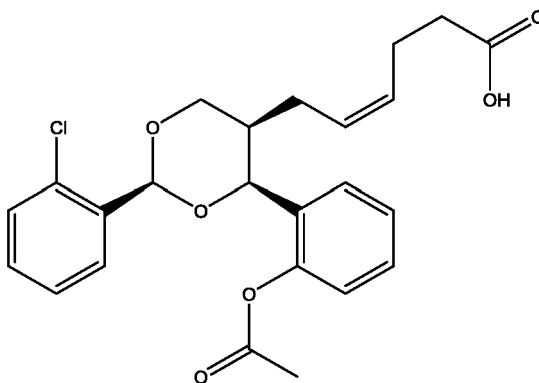
30

Otro compuesto preferido para su uso en la invención es un compuesto de la siguiente estructura:



(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoato de metilo

5 Otro compuesto preferido para su uso en la invención es un compuesto de la siguiente estructura:



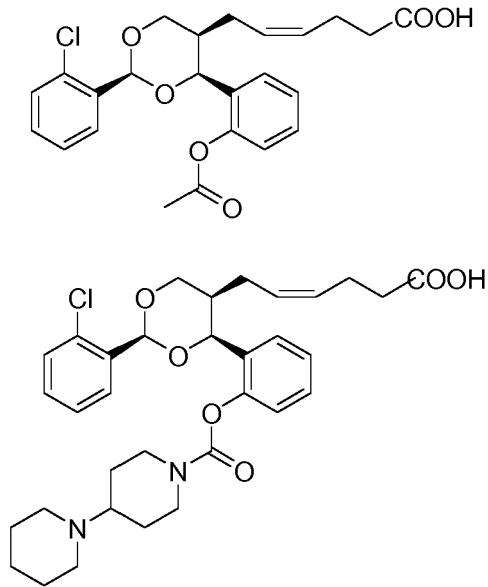
ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-4-(2-acetoxifenil)-2-(2-clorofenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico

10 Los moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS útiles para uso de acuerdo con la invención se pueden preparar y administrar como profármacos de cualquiera de los compuestos antes mencionados. Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos para uso en la invención descritos en este documento pueden incluir grupos funcionales que se pueden enmascarar con progrupos para crear profármacos. Dichos profármacos son generalmente, pero no tienen por qué ser, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en su forma de fármaco activo. En los profármacos para uso en la invención, cualquier resto funcional disponible se puede enmascarar con un progrupo para producir un profármaco. Son conocidos en la técnica infinidad de progrupos adecuados para enmascarar dichos grupos funcionales para dar prorrastos que pueden escindirse en las condiciones deseadas de uso.

20 Como se usa en este documento, el término "profármaco" significa una sustancia que se transforma *in vivo* para producir una sustancia de la presente invención. La transformación puede ocurrir por diversos mecanismos, tales como a través de hidrólisis en sangre. Por ejemplo, cuando un compuesto para uso en la presente invención contiene un grupo funcional ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido por un grupo que incluye, pero sin limitación, grupos tales como por ejemplo  
 25 (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcanoiloximetilo (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), 1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)etilo que tiene 5-10 átomos de carbono, alcoxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcoxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N(alcoxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)aminoalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), carbamoilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), N,N-dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)carbamoilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) y piperidino-, pirrolidino- o morfolinalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>). El profármaco también puede ser un compuesto en el que un grupo -COOH ha reaccionado con un sacárido para formar un éster, siendo el sacárido preferiblemente un mono- o disacárido, más preferiblemente un monosacárido, aún más preferiblemente glucosa.

35 Algunos de los compuestos para uso en la invención que tienen un grupo funcional que puede ser derivatizado, tal como los grupos funcionales fenólicos, el grupo carboxílico funcional, el grupo funcional tiol, y similares, se pueden usar para la síntesis de profármacos. Los profármacos ejemplares de los compuestos para uso en la invención incluyen:

40

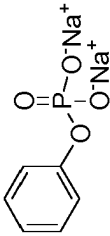
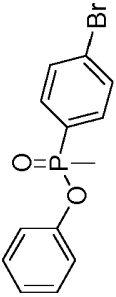
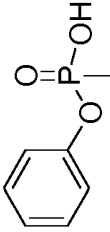
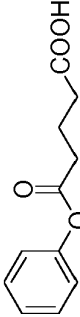
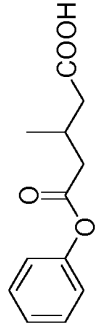
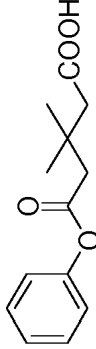
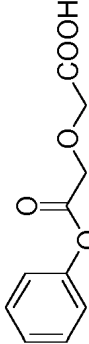
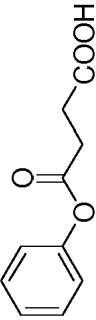

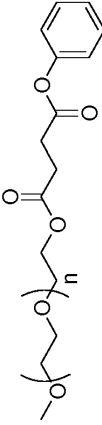
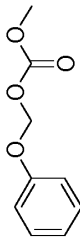
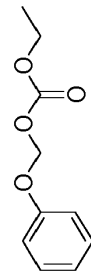
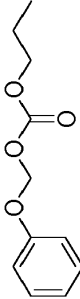
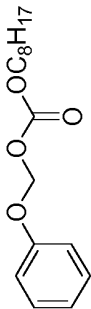
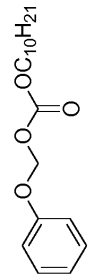
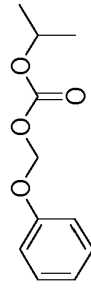


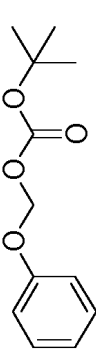
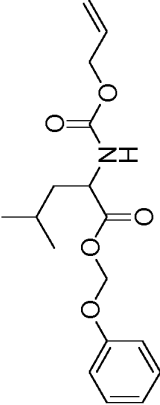
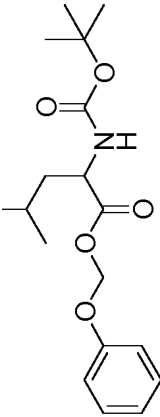
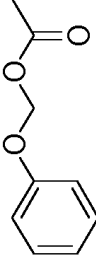
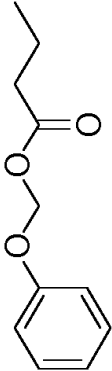
5 De esta manera, se pueden obtener profármacos adaptados específicamente para los modos de administración seleccionados. El progrupo también puede ser diseñado para conferir al profármaco otras propiedades, tales como, por ejemplo, absorción pasiva intestinal mejorada, absorción intestinal mediada por transporte mejorada, protección frente al metabolismo rápido (profármacos de liberación lenta), suministro selectivo de tejido, enriquecimiento pasivo en los tejidos diana, transportadores de orientación específica, etc. Lo grupos capaces de conferir a profármacos estas características son bien conocidos, y se describen, por ejemplo, en Etmayer et al. (2004) J. Med. Chem. 47: 2393-2404. Todos los diversos grupos descritos en estas referencias pueden ser utilizados en los profármacos descritos en este documento. En particular, el grupo fenol se puede convertir en ésteres de fosfato, ésteres de alquilo, o derivatizarse usando polietilenglicol (PEG), alquiloxicarboniloximetilo (AOCOM), o como un alcoxycarboniloximetilo estéricamente impedido, como se ilustra a continuación.

10

15

PROFÁRMACOS FENÓLICOS

ÉSTERES DE FOSFATO		
		
ÉSTERES DE ALQUILO		
		
		
DERIVADOS DE PEG		
		
		
DERIVADOS DE ALQUILOXICARBONILOXIMETILO (AOCOM) DERIVADOS		
		
		

DERIVADOS DE ALQUILOXICARBONILOXIMETILO (AOCOM) DERIVADOS	
	
DERIVADOS DE ALCOXICARBONILOXIMETILO ESTÉRICAMENTE IMPEDIDOS	
	
	

Los moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para su uso según la invención también incluyen los solvatos de cualquiera de los compuestos antes mencionados.

5 Como se usa en este documento, el término "solvato" significa cualquier compuesto de la invención o una sal del mismo que incluya además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de un disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Los disolventes preferidos son volátiles, no tóxicos, y/o aceptables para la administración a seres humanos en cantidades traza. Las formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas, son equivalentes a las formas no solvatadas y se engloban dentro del alcance de la presente invención.

10 Como se ha descrito anteriormente en este documento, los moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para uso según la invención tienen una estereoquímica específica como se describe anteriormente. Se prefiere que cualquier composición de la invención comprenda un compuesto sustancialmente enantiomérico puro. Por consiguiente, se prefiere que los moduladores de PPAR, antagonistas del receptor TP y/o inhibidores de la TS para uso en la invención tengan una pureza óptica de al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, aún más preferiblemente al menos un 95 %, todavía más preferiblemente al menos un 98 %, aún más preferiblemente al menos un 99 %, todavía más preferiblemente al menos un 99,5 %, todavía más preferiblemente al menos un 99,8 %, por ejemplo al menos un 99,9 %, tal como esencialmente un 100 %, por ejemplo un 100 % de pureza óptica.

20 Los compuestos de fórmula XI, fórmula XII, fórmula XIII y fórmula XIV se pueden fabricar por procedimientos convencionales de química orgánica bien conocidos en la técnica para la fabricación de compuestos estructuralmente análogos. Dichos procedimientos se proporcionan por ejemplo en el documento EP 0.094.239, páginas 4 -10, y por los procedimientos descritos en la sección de Ejemplos y por los siguientes procesos, en los que X, Y y Z tienen cualquiera de los significados definidos anteriormente en este documento:

25 (A) Se hace reaccionar un aldehído de fórmula IV con un reactivo de Wittig de fórmula  $R^1_3P=CH(CH_2)_2CO_2-M^+$  en la que  $R^1$  es alquilo o arilo (C1-6) (especialmente fenilo) y  $M^+$  es un catión, por ejemplo un catión de metal alcalino tal como el catión de litio, sodio o potasio. En algunas realizaciones, se hace reaccionar el aldehído con un reactivo de Wittig de fórmula modificada a  $P=CH(CH_2)_n COO. M^+$  donde  $n=0$  a 4.

30 El proceso en general produce los compuestos requeridos para uso en la invención en los que los sustituyentes adyacentes al doble enlace tienen predominantemente estereoquímica relativa *cis*, concretamente el isómero "Z". Sin embargo, el proceso produce también compuestos análogos que tienen estereoquímica relativa *trans* que se puede retirar mediante un procedimiento convencional tal como cromatografía o cristalización, si se desea.

35 El proceso sintético se realiza convenientemente en un disolvente o diluyente adecuado, por ejemplo un disolvente aromático tal como, tolueno o clorobenceno, un éter tal como 1,2-dimetoxietano, terc-butilmetiléter, dibutiléter o tetrahidrofurano, en dimetilsulfóxido o tetrametilensulfona, o en una mezcla de uno o más de dichos disolventes o diluyentes. El proceso se realiza generalmente a una temperatura en el intervalo, por ejemplo, de -80 °C a 40 °C, pero se realiza convenientemente a o cerca de temperatura ambiente, por ejemplo en el intervalo de 0 a 35 °C.

40 (B) Un derivado de fenol de la fórmula V en la que  $R^1$  es un grupo protector, por ejemplo alquilo (C1-6) (tal como metilo o etilo), acilo (tal como acetilo, benzilo, metanosulfonilo o p-toluenosulfonilo), alilo, tetrahidropiran-2-ilo, trimetilsililo, y se desprotege.

45 Las condiciones de desprotección usadas dependen de la naturaleza del grupo protector  $R^1$ . Así, por ejemplo, cuando es metilo o etilo, la desprotección puede llevarse a cabo por calentamiento con tioalcóxido de sodio (hidruro y alcanotiol) en un disolvente adecuado (tal como N,N-dimetilformamida o N,N-dimetil-3,4, 5,6-tetrahidro-2 (1H)pirimidinona) a una temperatura en el intervalo, por ejemplo, de 50 a 160 °C. Como alternativa, un grupo protector etilo o metilo puede retirarse por reacción con difenilfosfuro de litio en un disolvente adecuado (tal como tetrahidrofurano o metil-terc-butiléter) a una temperatura en el intervalo, por ejemplo, de 0 a 60 °C. Cuando el grupo protector es acilo, puede retirarse, por ejemplo, por hidrólisis en presencia de una base (tal como hidróxido sódico o potásico) en un disolvente acuoso adecuado [tal como una solución acuosa de alcohol (C1-4)] a una temperatura en el intervalo, por ejemplo, de 0 a 60 °C. Cuando el grupo protector es alilo o tetrahidropiran-2-ilo, puede retirarse, por ejemplo, por tratamiento con ácido fuerte tal como ácido trifluoroacético, y cuando es trimetilsililo, puede retirarse, por ejemplo, por reacción con fluoruro de tetrabutilamonio acuoso o fluoruro de sodio usando un procedimiento convencional.

50 (C) Se hace reaccionar un derivado de eritro-diol de la fórmula VI en la que uno de  $Q^1$  y  $Q^2$  es hidrógeno y el otro es hidrógeno o un grupo de la fórmula  $-CRaRb.OH$  (en la que Ra y Rb son el mismo o diferentes alquilo (C1-4)), con un derivado de benzaldehído de la fórmula VII o un acetal, hemiacetal o hidrato del mismo.

55 El benzaldehído VII [o su hidrato, su acetal o hemiacetal con un alcohol (C1-4) (tal como metanol o etanol)] puede estar convenientemente presente en exceso.

La reacción se realiza generalmente en presencia de un catalizador ácido tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido canfosulfónico, ácido cítrico, ácido piridinio-p-toluenosulfónico (PPTS) o ácido p-toluenosulfónico, convenientemente en presencia de un disolvente o diluyente adecuado, tal como tolueno, xileno o un éter, por ejemplo tetrahidrofurano, dibutiléter, metil-terc-butiléter o 1,2-dimetoxietano o halogenoalcano, tal como diclorometano (DCM), y a temperatura en el intervalo, por ejemplo, de 0 a 80 °C.

Aquellos materiales de partida de fórmula VI en la que  $Q^1$  y  $Q^2$  son ambos hidrógeno pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis o alcoholisis moderada catalizada por ácido del anillo de dioxano de un compuesto de fórmula VII, en la que Ra y Rb son ambos alquilo tales como metilo o etilo, obtenidos por un procedimiento análogo al proceso (A) en la presente memoria. La hidrólisis o alcoholisis se llevará a cabo normalmente a una temperatura en el intervalo de 10 a 80 °C usando un ácido mineral acuoso tal como ácido clorhídrico en un alcohol (tal como etanol o 2-propanol) o un éter (tal como tetrahidrofurano) como disolvente.

Los materiales de partida de fórmula VI en la que uno de  $Q^1$  y  $Q^2$  es hidrógeno y el otro es un grupo de la fórmula --CRaRb.OH son intermedios en la formación mencionada anteriormente de los materiales de partida de fórmula VI, en la que  $Q^1$  y  $Q^2$  son ambos hidrógeno. Sin embargo, dichos intermedios no se aíslan ni caracterizan normalmente. Por lo tanto, una modificación útil del proceso (C) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula VIII en la que uno de Ra y Rb es hidrógeno, metilo o etilo y el otro es metilo o etilo con un exceso de un compuesto de la fórmula VII (o un hidrato, acetal o hemiacetal del mismo) en presencia de un catalizador ácido (tal como uno de los dados anteriormente), convenientemente a una temperatura en el intervalo, por ejemplo, de 10 a 80 °C, y opcionalmente en presencia de un disolvente o diluyente adecuado (tal como uno de los dados anteriormente).

Los materiales de partida para uso en los procesos anteriores pueden elaborarse mediante procedimientos generales de la química orgánica conocidos para la preparación de compuestos estructuralmente relacionados. Por tanto, los aldehídos de la fórmula IV pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el procedimiento mostrado en el Esquema I. Los derivados de fenol protegido de fórmula V se pueden elaborar, por ejemplo, mediante el uso de un procedimiento análogo al proceso (a) anterior, usando un aldehído análogo al de fórmula IV, pero en el que el grupo fenol se ha protegido con el grupo R<sup>1</sup>, elaborándose dicho aldehído, por ejemplo, llevando a cabo los procedimientos del Esquema I omitiendo la etapa de desprotección (ii). Aquellos de los materiales de partida de fórmula VIII que son novedosos pueden obtenerse usando procedimientos análogos a los descritos en la solicitud de patente europea publicación n.º. 94239.

Los reactivos de Wittig necesarios pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo por tratamiento de los correspondientes haluros de fosfonio con una base fuerte tal como hidruro sódico, diisopropilamido de litio, terc-butóxido de potasio, LiHMDS o butil-litio. Por lo general, se forman *in situ* justo antes de llevar a cabo el proceso de condensación (A) anterior.

Se entenderá que los compuestos para uso en la invención pueden obtenerse también mediante otros procedimientos convencionales bien conocidos en la materia, por ejemplo mediante hidrólisis catalizada con base de los correspondientes ésteres, amidas o nitrilos.

Las sales descritas en este documento pueden obtenerse mediante reacción con la base apropiada que procure un catión fisiológicamente aceptable, o mediante cualquier otro procedimiento convencional.

Además, cuando se prepara un compuesto de cualquiera de las fórmulas XI, XII, XIII o XIV, que son todas formas ópticamente activas específicas, uno de los procesos antes mencionados se puede llevar a cabo usando un material de partida ópticamente activo. Como alternativa, puede hacerse reaccionar una mezcla racémica de un compuesto de cualquiera de las fórmulas XI, XII, XIII o XIV y su enantiómero o enantiómeros con una forma ópticamente activa de una base orgánica adecuada, seguido de separación convencional de la mezcla diastereoisomérica de sales obtenida de este modo, por ejemplo mediante cristalización fraccionada en un disolvente adecuado, por ejemplo un alcohol (C1-4), tras lo cual la forma ópticamente activa de dicho compuesto de fórmula I o II se puede liberar mediante tratamiento con ácido usando un procedimiento convencional, por ejemplo usando un ácido mineral acuoso tal como ácido clorhídrico diluido.

Como se afirma anteriormente, los compuestos descritos en este documento son moduladores de la actividad de PPAR. Por tanto, además de las características estructurales resumidas anteriormente, son también compuestos preferidos para usar con los procedimientos según la presente invención agonistas de PPAR, antagonistas de PPAR o agonistas parciales de PPAR, preferiblemente agonistas parciales de PPAR. Los procedimientos para determinar las funcionalidades como agonista/antagonista/agonista parcial de PPAR se describen en este documento a continuación en la sección "Funcionalidades de compuestos"

#### Funcionalidades de compuestos

Los compuestos preferidos para uso en la invención son cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en este documento que son moduladores de PPAR, en particular moduladores selectivos de PPAR-gamma (agonistas o antagonistas totales o parciales, preferiblemente agonistas), antagonistas del receptor TP o inhibidores de la TS, o compuestos que exhiben dos o más de estas propiedades. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, los presentes inventores creen que los compuestos que son antagonistas del receptor TP e inhibidores de la TS son particularmente deseables, ya que esto conduce a un aumento de los niveles de PGI<sub>2</sub>, que inhibe la agregación de plaquetas y actúa como un potente vasodilatador.

Los agonistas y antagonistas se caracterizan por sus afinidades de unión, que dictan la potencia/CE<sub>50</sub>/valores de CI<sub>50</sub>, y por el nivel de actividad, que se logra en presencia de niveles de saturación de los compuestos, concretamente, la eficacia. Un agonista parcial/antagonista parcial también se caracteriza por su afinidad de unión y eficacia. Por tanto, un agonista parcial/antagonista parcial de PPAR es incapaz de activar completamente el PPAR asociado y puede desplazar de manera competitiva un agonista total del receptor y con ello disminuir el nivel de la transactivación. Los agonistas totales y parciales de PPAR, además, pueden reclutar diferentes complementos de cofactores, y la naturaleza de los cofactores reclutados para un subtipo de PPAR dado puede influir profundamente en el patrón de genes activados por un agonista dado.

Los bolsillos de unión a ligando de los PPAR son grandes en comparación con otros receptores nucleares, y esto puede explicar en parte la gran variedad de compuestos que son capaces de unirse a y activan los PPAR. Hay una considerable superposición en el reconocimiento de ligandos entre los tres subtipos de PPAR, y en sentido estricto, no se ha identificado todavía ningún ligando específico de subtipo. Sin embargo, varios ligandos naturales y sintéticos exhiben un alto grado de selectividad, y los ligandos más selectivos hoy difieren en más de 3 órdenes de magnitud con respecto a la concentración necesaria para activar los subtipos individuales de PPAR. En analogía con los agonistas para los receptores nucleares de esteroides, se ha introducido el término moduladores de PPAR selectivos (SPPARM) (denominados también en este documento como "agonistas o antagonistas parciales"). Esta clase de ligando comprende agonistas /antagonistas parciales que, tras la unión a PPAR, introducen diferentes conformaciones que conducen al reclutamiento de los diferentes conjuntos de coactivadores. En principio, un SPPARM sería capaz de activar sólo un subconjunto de los genes diana de PPAR, promoviendo posiblemente así la expresión específica de un conjunto deseable de genes. Se da un modelo de la activación de PPAR por un agonista completo y un agonista parcial en la Fig. 1. Los compuestos preferidos según la presente invención son agonistas parciales de PPAR.

La actividad moduladora de PPAR se puede determinar fácilmente mediante cualquier serie de procedimientos conocidos en la materia o adaptaciones de los mismos. Por ejemplo, la actividad de modulación de PPAR puede determinarse mediante un ensayo de transactivación *in vitro*. Se describe un ejemplo no limitante de un ensayo de transactivación útil para determinar la actividad moduladora de PPAR-gamma en el ejemplo 2 en este documento a continuación, y se describe un ejemplo no limitante de un ensayo de transactivación útil para determinar la actividad moduladora de PPAR-delta en el ejemplo 3. El Ejemplo 2 a continuación ilustra un procedimiento en el que se añaden compuestos a las células transfectadas con un constructo que codifica una proteína de fusión PPAR-GAL4 (dominio de unión a ADN) y un constructo que codifica un constructo indicador dependiente de GAL4. Será evidente para un experto en la técnica que se puede usar cualquier número de posibles constructos, tal como el uso de diferentes dominios de unión a ADN para activar la transcripción o de diferentes genes indicadores (por ejemplo, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, peroxidasa, luciferasa, o similares). También será evidente para un experto en la técnica que, dependiendo de la actividad de PPAR sea deseable determinar, el constructo preferiblemente codifica dicho PPAR o un dominio de unión a ligando del mismo. Tras la activación de PPAR (concretamente, en presencia de un agonista o agonista parcial de PPAR), el PPAR transactiva el constructo indicador, opcionalmente de una manera cuantitativa.

Los moduladores de PPAR también se pueden identificar usando un gen indicador que comprende un primer ácido nucleico bajo el control operativo de un segundo ácido nucleico que comprende al menos un PPRE. El primer ácido nucleico codifica preferiblemente una proteína indicadora, tal como una proteína fluorescente, beta-galactosidasa, peroxidasa, luciferasa, o similares. Dicho constructo indicador debe insertarse en una célula que exprese uno o más PPAR, tales como PPAR-gamma y/o delta. Los agonistas de PPAR pueden así identificarse como compuestos capaces de activar la transcripción del primer ácido nucleico.

Según una realización específica de la invención, los compuestos preferidos son agonistas o agonistas parciales de PPAR y/o LBD de PPAR. El término "PPAR LBD" hace referencia al dominio de unión a ligando de PPAR. Según una realización preferida, los compuestos y composiciones de la presente invención son agonistas de PPAR-gamma y/o LBD de PPAR-gamma. Se entiende por "agonista" un compuesto o composición que, cuando se combina con un receptor intracelular, estimula o aumenta una reacción típica para el receptor, por ejemplo, la actividad de activación de la transcripción. En una realización, dicho agonista es un agonista de PPAR-gamma, concretamente, un ligando de PPAR que potencia, estimula, induce o mejora de otra manera la actividad transcripcional de un receptor PPAR-gamma, por ejemplo, tal como imitando un ligando fisiológico natural para el receptor.

Dicha actividad moduladora de PPAR se puede determinar usando los ensayos de transactivación descritos en este



documento anteriormente. Los agonistas estándares adecuados incluyen rosiglitazona para PPAR-gamma y ácido (4-[3-(2-propil-3-hidroxi-4-acetil)fenoxi]propiloxifenoxi)acético (L165041, disponible comercialmente) para PPAR-delta. Los agonistas potenciales que exhiben menos de un 50 % de la transactivación de un agonista estándar todavía pueden ser útiles, en particular para el desarrollo de nuevos compuestos o derivados activos o como un indicador de la presencia de un agonista parcial.

Según una realización preferida, los compuestos y composiciones de la presente invención son agonistas parciales de PPAR y/o LBD de PPAR, y más particularmente, los compuestos y composiciones de la presente invención son agonistas parciales de PPAR-gamma y/o LBD de PPAR-gamma. Un fármaco que produce menos que el posible efecto máximo (concretamente, el efecto máximo producido por un agonista completo o molécula de referencia) se denomina un agonista parcial.

Por ejemplo, la propiedad agonista parcial de los compuestos y composiciones de la presente invención puede definirse por referencia a la rosiglitazona (Avandia™, Glaxo-SmithKline), que es un agonista completo. Este es en particular el caso de los agonistas parciales de PPAR-gamma. Los agonistas parciales de PPAR, en particular los agonistas de PPAR-gamma, de la invención proporcionarán una eficacia similar o mejor a un paciente sometido a un tratamiento deseado, pero tendrán menos efectos secundarios indeseables que serían perjudiciales para el paciente. Por ejemplo, la SN1 (DPD) induce el mismo nivel de captación de glucosa a 10 mM que Avandia 1 mM, pero se esperan menos efectos secundarios como consecuencia de una menor diferenciación de los adipocitos.

La propiedad agonista parcial de los compuestos y composiciones de la presente invención también puede definirse por referencia a L165041 (disponible comercialmente). Este es en particular el caso de los agonistas parciales de PPAR-delta. Por ejemplo, uno de dichos ensayos de transactivación es el ensayo de transactivación descrito en el ejemplo 3.

En una realización, se prefiere que los compuestos de la invención sean selectivos para la activación de PPAR. En dicha realización, se prefiere que el compuesto no active significativamente la transactivación de RxR y/o LBD de RxR, preferiblemente la transcripción de RxR es menos de 2 veces los niveles de fondo, tal como menos de 1,5 veces los niveles de fondo, por ejemplo aproximadamente igual a o menor que el nivel de fondo. La transactivación de RxR puede determinarse mediante un ensayo de transactivación de RxR, por ejemplo como se describe en el ejemplo 5. El nivel de fondo es la transactivación en ausencia de un ligando añadido.

En una realización de la invención, los compuestos son antagonistas de PPAR. Se entiende por "antagonista" un compuesto que, cuando se combina con PPAR, interfiere o disminuye una reacción típica para dicho PPAR, por ejemplo, la activación de la transcripción. Como una definición general, "antagonista de PPAR" designa un ligando de PPAR que puede inhibir la actividad de un agonista de PPAR correspondiente. Más generalmente, estas actividades agonista/antagonista /agonista parcial se pueden medir mediante ensayos ampliamente conocidos por un experto en la materia tales como, por ejemplo, aquellos que se dan a conocer en los documento WO99/50664 o WO96/41013.

En una realización muy preferida de la invención, el modulador de PPAR tiene una  $CI_{50}$  en relación con la unión a PPAR de como máximo 25  $\mu M$ , preferiblemente de como máximo 20  $\mu M$ , aún más preferiblemente de como máximo 10  $\mu M$ , por ejemplo como máximo 5  $\mu M$ . Dentro de esta realización de la invención, el PPAR preferido es PPAR $\gamma$  y son moduladores de PPAR muy preferidos los moduladores de PPAR $\gamma$  que tienen una  $CI_{50}$  en relación con la unión a PPAR de como máximo 25  $\mu m$ , preferiblemente de como máximo 20  $\mu M$ , aún más preferiblemente de a los sumo 15  $\mu M$ , por ejemplo como máximo 12  $\mu M$ . La  $CI_{50}$  puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la materia.

Los compuestos y composiciones de la invención se caracterizan además por sus actividades biológicas cuando se administran a un paciente que tiene una afección o enfermedad que se ve afectada por la modulación de la actividad de PPAR. Los compuestos preferidos según la presente invención son compuestos capaces de reducir una o más de las siguientes entidades biológicas en un paciente necesitado de ello: glucosa, triglicéridos, ácidos grasos, colesterol, ácidos biliares y similares, con una eficacia y potencia mejor o equivalente, pero con menor toxicidad y/o la aparición de un menor número de efectos secundarios no deseables en comparación con las moléculas conocidas en la materia (por ejemplo, tiazolidindionas). En particular, dichos compuestos conducen preferentemente a una menor inducción de la diferenciación de adipocitos y aumento de peso. Dichos compuestos pueden ser, en particular, cualquiera de los compuestos descritos en la sección C anteriormente en este documento. Los procedimientos útiles para la determinación de la diferenciación de adipocitos se describen en el ejemplo 6 en este documento a continuación. Más específicamente, presentan actividades beneficiosas frente a la resistencia a la insulina (disminución de la eficacia de la insulina para bajar los niveles de glucosa en plasma) y/o la adipogénesis. Se ha mostrado que muchos compuestos que activan PPAR-gamma (por ejemplo, tiazolidindionas) inducen además la diferenciación de adipocitos (concretamente, exhiben un efecto adipogénico o lipogénico) y por tanto dan lugar a un incremento del peso corporal en los pacientes tratados. Por lo tanto, es muy deseable que la próxima generación de dichos compuestos muestren una actividad reducida y preferiblemente estén desprovistos de dicha actividad. Estas actividades se pueden valorar mediante procedimientos ampliamente usados en la materia. Más

específicamente, estas actividades son valoradas con referencia a una molécula que ya se ha identificado en la materia, tal como rosiglitazona. Según una realización preferida de la invención, los compuestos preferidos exhiben al menos aproximadamente un 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 60 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70 % y aún más preferiblemente al menos un 80 % de la propiedad de rosiglitazona con respecto a resistencia a la insulina, que, por ejemplo, se puede determinar mediante la determinación de los niveles de glucosa en pacientes que padecen resistencia a la insulina. Idealmente, será de 100 % o más. Según otra realización preferida de la presente invención, los compuestos preferidos exhiben menos de aproximadamente un 80 %, preferiblemente menos de aproximadamente un 50 %, más preferiblemente menos de aproximadamente un 40 % y aún más preferiblemente menos de aproximadamente un 30 %, de la propiedad de rosiglitazona frente a la diferenciación de adipocitos. Idealmente, esta será menor de un 20 % de la propiedad de rosiglitazona frente a la diferenciación de adipocitos. La diferenciación de adipocitos puede determinarse, por ejemplo, como se describe en este documento a continuación en el ejemplo 6. En una realización muy preferida, los compuestos preferidos tienen ambas propiedades antes mencionadas. Como alternativa, los compuestos son capaces de inducir la actividad de PPAR como se determina en un ensayo de transactivación en un grado que es al menos un 50 % del de la de rosiglitazona y exhiben la propiedad antes mencionada frente a la diferenciación de adipocitos.

En una realización muy preferida de la presente invención, el modulador de PPAR es capaz de reducir uno o más, tal como 2, 3 o 4 propiedades seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes entidades biológicas en un individuo: glucosa en suero, hemoglobina glucosilada (HbA1C), fructosamina, insulina, ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol total. Aún más preferiblemente, el modulador de PPAR es capaz de reducir una o más, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente las 3 de las siguientes entidades biológicas en un individuo: glucosa en suero, hemoglobina glucosilada (HbA1C) y ácidos grasos libres (AGL).

En particular, los moduladores de PPAR preferidos son aquellos en los que la administración del modulador de PPAR a un individuo a una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg/día, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg/día, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg/día, tal como 5 mg/kg/día da lugar a una disminución de la glucosa en suero de al menos un 10 %, tal como al menos un 15 %, por ejemplo al menos un 20 %, tal como al menos un 24 % después de un intervalo de 7 a 365 días, tal como en el intervalo de 7 a 180 días, por ejemplo en el intervalo de 7 a 90 días, tal como en el intervalo de 7 a 30 días, por ejemplo al cabo de 14 días de la administración.

Además, los moduladores de PPAR preferidos son aquellos en los que la administración de dicho modulador de PPAR a un individuo a una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg/día, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg/día, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg/día, tal como 5 mg/kg/día, da lugar a una disminución de la HbA1c de al menos un 0,2 %, tal como al menos un 0,5 %, por ejemplo al menos un 1 %, tal como al menos un 2 % después de un intervalo de 7 a 365 días, tal como en el intervalo de 7 a 180 días, por ejemplo en el intervalo de 7 a 90 días, tal como en el intervalo de 7 a 30 días, por ejemplo al cabo de 14 días de la administración. El intervalo de referencia en pacientes sanos para los valores de HbA<sub>1c</sub> es de aproximadamente 4 % -5,9 % y son deseables valores por debajo de 6,5 % -7 % después de la administración del modulador de PPAR para pacientes necesitados de tratamiento.

Además, los moduladores de PPAR preferidos son moduladores de PPAR en los que la administración de dicho modulador de PPAR a un individuo a una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg/día, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg/día, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg/día, tal como 5 mg/kg/día, da lugar a una disminución de AGL de al menos un 10 %, tal como al menos un 15 %, por ejemplo al menos un 20 %, tal como al menos un 22 % después del intervalo de 7 a 365 días, tal como en el intervalo de 7 a 180 días, por ejemplo en el intervalo de 7 a 90 días, como en el intervalo de 7 a 30 días, por ejemplo al cabo de 14 días de la administración. El intervalo de referencia en pacientes sanos para los valores de AGL es de aproximadamente 0,28-0,89 mmol/litro y es deseable una disminución/normalización de los valores hacia este intervalo tras la administración del modulador de PPAR para pacientes necesitados de tratamiento.

Además, los moduladores de PPAR preferidos son moduladores de PPAR en los que la administración de dicho modulador de PPAR a un individuo a una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg, tal como 5 mg/kg no causa un aumento significativo en el peso corporal en el intervalo de 7 a 365 días, tal como en el intervalo de 7 a 180 días, por ejemplo en el intervalo de 7 a 90 días, tal como en el intervalo de 7 a 30 días, por ejemplo al cabo de 14 días en dicho individuo. Se entiende por "aumento significativo del peso corporal" un cambio en el peso corporal que es más de un 1 %, tal como más de un 2 %, por ejemplo más de un 3 %, tal como más de un 4 %, por ejemplo más de un 5 %, tal como más de un 6 %, tal como más de un 7 % de aumento del peso corporal.

Además, los moduladores de PPAR preferidos son moduladores de PPAR en los que la administración de dicho modulador de PPAR a una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg, tal como 5 mg/kg no da lugar a un cambio significativo en la ingesta diaria de alimentos en dicho individuo. Se entiende por "cambio significativo en la ingesta de comida media" un cambio que es más de un 10 %, tal como más de un 12 %, por ejemplo más de un 14 %, tal como más de un 16

% en la ingesta diaria de alimentos como se determina por el peso.

Además, los moduladores de PPAR preferidos son moduladores de PPAR en los que la administración de dicho modulador PPAR a un individuo en una dosificación en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como en el intervalo de 0,5 a 70 mg/kg, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 7,5 mg/kg, tal como 5 mg/kg no da lugar a un aumento significativo en uno o más, preferiblemente al menos 2, tal como al menos 3, por ejemplo todas las 4 siguientes entidades biológicas: Hematocrito, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP) en dicho individuo. Se entiende por "aumento significativo" un aumento de más del 30 %, por ejemplo de más del 20 %, tal como de más del 10 %, por ejemplo de más del 5 %. El intervalo de referencia en pacientes sanos para el hematocrito es de 0,41-0,50 (sin unidades), para AST es de 10-30 U/l, 10-40 U/l y de 30-120 U/l para ALP y es deseable una disminución/normalización de estos valores hacia estos intervalos tras la administración del modulador de PPAR a pacientes necesitados de tratamiento.

Todos los individuos antes mencionados en esta sección pueden ser cualquier individuo, tal como un individuo necesitado de administración de un modulador de PPAR, por ejemplo un ser humano que padece una o más de las afecciones clínicas relacionadas con PPAR mencionadas en otro lugar de este documento. Sin embargo, el individuo también puede ser un animal de ensayo de laboratorio, por ejemplo un ratón. Todas las disminuciones y aumentos mencionados anteriormente en esta sección se determinan, en general, en función de los valores obtenidos en individuos similares a los que no se ha administrado dicho modulador de PPAR. Se describe un ejemplo no limitante de procedimientos adecuados para determinar las disminuciones y aumentos en las entidades biológicas mencionadas anteriormente en este documento a continuación en el Ejemplo 12.

La aparición *in vivo* de efectos secundarios indeseables tales como hemodilución, edema, la diferenciación de adipocitos u obesidad puede estar influida por el perfil de reclutamiento de cofactores de dichos compuestos, por ejemplo usando procedimientos descritos en el documento EP1267171. Por lo tanto, en una realización de la invención, los compuestos preferidos son compuestos que se predice que tienen bajo contenido de aparición *in vivo* de efectos secundarios indeseables.

Es ampliamente reconocido que los receptores nucleares, tales como PPAR-gamma, logran la activación o represión transcripcional mediante la unión a secuencias asociadas en las regiones promotoras de los genes diana y mediante el reclutamiento de numerosos complejos de cofactor cuyas actividades van desde la remodelación de la cromatina, modificación de histonas y cofactores, al reclutamiento de la maquinaria de transcripción básica (Glass y Rosenfeld, 2000, Genes Dev., 14, 121-141). Estos cofactores pueden determinar en gran medida la especificidad de la acción de los receptores nucleares e integrar su acción en una red de estímulos cuya orquestación apropiada conduce a una respuesta celular específica. Por ello, la determinación de las múltiples asociaciones que entabla cada receptor nuclear, en función del tiempo y tipo celular, conducirá a una mejor comprensión de la actividad de los receptores nucleares en la regulación transcripcional. Por ejemplo, es conocido que para ciertas hormonas, como el estrógeno, la respuesta a la hormona se determina casi en la misma medida por la presencia del respectivo receptor de hormona nuclear que por la presencia de los cofactores que interactúan con el receptor. Se han identificado diversos cofactores de PPAR. Algunos cofactores tales como p300/CBP (Dowell et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 33435-33433), SRC-1 (Onate et al., 1995, Science 270, 1354-1357), TIF2 (GRIP-2; Chakravarti et al., 1996, Nature, 383, 99-103), SRA (Lanz et al., 1999, Cell, 97, 17-27), Alb-1 (Anzick et al., 1997, Science, 277, 965-968), TRAP220/DRIP205 (concretamente, PBP; Zhu et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 25500-25506; Rachez et al., 1999, Nature, 398, 824-828), PGC-1 (Puigserver et al., 1998, Cell 92, 829-839), PRIP (Zhu et al., 2000, J Biol Chem 275, 13510-13516), PGC-2 (Castillo et al., 1999, Embo J, 18, 3676-3687), ARA70 (Heinlein et al., 1999, J Biol Chem 274, 16147-16152), RIP140 (Treuter et al., 1998, Mol Endocrinol 12, 864-881), mejoran su actividad transcripcional, mientras que SMRT (Lavinsky et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2920-2925) y N-CoR (Dowell et al., J Biol Chem 274, 1590-15907) la reprimen. Adicionalmente, se ha mostrado que los miembros de la familia de cofactores de PPAR-gamma (por ejemplo, la proteína de 160-kDa (SRC-1/TIF2/AIB-1), CBP/p300 o TRAP220/DRIP205) interactúan directamente con PPAR-gamma y potencian la función de transactivación de receptor nuclear de una forma dependiente de ligando, conduciendo a una acción biológica o efectos secundarios que pueden diferir según el ligando usado (Adams et al., 1997, J. Clin. Invest. 100, 3149-3153). Kodera et al, (2000, J Biol Chem., 275, 33201-33204) han examinado si las interacciones entre PPAR-gamma y cofactores conocidos se inducían en la misma medida por diferentes clases de ligandos de PPAR-gamma (sintéticos y naturales) y llegaron a la conclusión de que la estructura general de los complejos de PPAR-gamma y cofactores puede ser diferente según los ligandos involucrados, lo que da lugar a la activación de un conjunto particular de promotores de genes diana que ejercen diferentes acciones biológicas.

Los agonistas parciales de PPAR tendrán en general un perfil particular de reclutamiento de coactivador, por tanto se prefieren los compuestos con perfiles particulares de reclutamiento de coactivador. Por tanto, según realizaciones especiales, los compuestos y composiciones de la presente invención se caracterizan además por un patrón de reclutamiento de cofactor o cofactores restringido. En realizaciones preferidas, dicho patrón da lugar a distintos efectos sobre la regulación de la actividad transcripcional de dichos receptores nucleares que permiten una regulación muy finamente ajustada que da lugar a la activación de procesos metabólicos específicos, así como a la eliminación de efectos secundarios no deseados. En realizaciones más específicas, los compuestos y

composiciones de la presente invención son además capaces de inhibir la interacción del receptor PPAR, más preferiblemente el LBD del receptor PPAR, con el cofactor TIF2. Según otra realización, los compuestos y composiciones de la invención son, adicionalmente capaces de mejorar la interacción del receptor PPAR, más preferiblemente el LBD del receptor PPAR, con el cofactor SRC-1. Preferiblemente, dicho receptor PPAR es un receptor PPAR-gamma.

Los procedimientos para medir la inhibición y/o la mejora del reclutamiento de cofactores por ligandos se detallan en el documento EP1267171.

En una realización preferida, los compuestos de la invención, cuando se unen a PPAR-gamma, permitirán el reclutamiento de SRC1 en el LBD con una  $CE_{50}$  que es al menos un orden de magnitud mayor que el de TIF2, prefiriéndose al menos 2 órdenes de magnitud.

En una realización de la invención, los compuestos preferidos debido a su propiedad agonista, en particular agonista parcial, o antagonista hacia ligandos fisiológicos naturales de los receptores PPAR, especialmente los del receptor PPAR-gamma, son capaces de servir como productos farmacéuticos para el control de los efectos biológicos de PPAR mediados por el control de la transcripción y los efectos fisiológicos concomitantes producidos de ese modo. Más específicamente, pueden modular una fisiología celular para reducir una patología asociada o proporcionar o mejorar la profilaxis.

En aún otra realización de la invención, los compuestos preferidos son compuestos que son agonistas o agonistas (o preferiblemente agonistas parciales) de más de un PPAR, por ejemplo tanto de PPAR-gamma como PPAR-delta. Dichos agonistas pueden identificarse mediante ensayos de transactivación para PPAR-gamma y PPAR-delta, respectivamente, por ejemplo como se describe en este documento. Se describen procedimientos no limitantes para la determinación de la actividad de PPAR-gamma y PPAR-delta en este documento a continuación en los ejemplos 7 y 8, respectivamente.

En una realización de la invención, los compuestos preferidos de la invención son capaces de unirse al receptor de tromboxano (TP), tal como capaces de unirse al receptor de tromboxano en células HEK-293 recombinantes humanas. En particular, se prefieren compuestos de la invención son capaces de unirse al receptor de tromboxano con una  $CI_{50}$  de menos de 100 nM, más preferiblemente menor de 50 nM, aún más preferiblemente menor de 30 nM, por ejemplo menor de 20 nM, tal como menor de 10 nM, por ejemplo menor de 5 nM, por ejemplo menor de 1 nM. Además, se prefieren compuestos de la invención capaces de unirse al receptor de tromboxano con una  $K_i$  de menos de 100 nM, más preferiblemente menor de 50 nM, aún más preferiblemente menor de 20 nM, tal como menor de 10 nM, por ejemplo menor de 5 nM, por ejemplo menor de 1 nM. Preferiblemente, las  $CI_{50}$  y  $K_i$  anteriormente mencionadas se determinan como se describe en este documento a continuación en el Ejemplo 15.

Los moduladores de receptor TP preferidos son antagonistas del receptor TP. La función fisiológica de los receptores TP incluye el control de agregación plaquetaria, vasoconstricción y broncoconstricción (véase el compendio de la IUPHAR de la caracterización y clasificación de receptores de 1998, página 239, y el Manual Sigma-RBI 5ª adición, "Prostanoid receptors", 2006, páginas 138-140). Por tanto, los moduladores de PPAR/TP preferidos según la invención, que son antagonistas de receptores TP, son útiles en el tratamiento de una afección clínica caracterizada por una o más de aumento de la agregación plaquetaria, aumento de la vasoconstricción y aumento de la broncoconstricción, infarto de miocardio, trombosis, trastornos trombóticos, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, nefropatías de IgA, síndrome hepatorenal, nefropatía diabética, retinopatía, retinopatía diabética, enfermedad arterial periférica, menor circulación en las extremidades, embolia pulmonar, formación de trombos, hiperplasia, choque séptico, preeclampsia, asma, rinitis alérgica, angiogénesis y metástasis tumorales, formación de trombos desencadenada por prótesis endovasculares, reestenosis inducida por prótesis endovasculares e hiperplasia desencadenada por prótesis endovasculares.

En una realización adicional, los compuestos de la invención son inhibidores de (concretamente, reducen) la actividad de la tromboxano sintasa (TS). El tromboxano está implicado en el control de la agregación plaquetaria, vasoconstricción y broncoconstricción y por tanto la inhibición de la tromboxano sintasa también puede ser útil en el tratamiento de una afección clínica caracterizada por una o más de aumento de agregación plaquetaria, aumento de vasoconstricción y aumento de broncoconstricción. La actividad de la tromboxano sintetasa se puede determinar mediante cualquier procedimiento útil conocido por el experto. Se describe un procedimiento útil en este documento a continuación en el Ejemplo 14. Los compuestos muy preferidos de la invención son capaces de inhibir la tromboxano sintasa en al menos un 30 %, preferiblemente al menos un 40 %, tal como al menos un 50 % a una concentración 10 mM usando el ensayo de la tromboxano sintasa plaquetaria humana descrito en este documento a continuación en el Ejemplo 14. Además, los compuestos muy preferidos de la invención son capaces de inhibir la tromboxano sintasa con una  $CI_{50}$  de como máximo 10.000 nM, preferiblemente como máximo 9000 nM, aún más preferiblemente como máximo 8.000 nM, aún más preferiblemente como máximo 7.500 nM, por ejemplo como máximo 7.100 nM, usando el ensayo de la tromboxano sintasa plaquetaria humana como se describe en este documento a continuación en el ejemplo 14.

Los compuestos preferidos de la invención son capaces de inhibir la agregación plaquetaria. En particular, se prefieren los compuestos capaces de inhibir la agregación de plaquetas (es decir, en condiciones de aumento de la agregación de plaquetas del compuesto, normalizaría la agregación de plaquetas) en al menos un 20 %, preferiblemente al menos un 40 %, más preferiblemente al menos un 50 %, aún más preferiblemente al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 94 %, por ejemplo al menos un 95 %, tal como al menos un 97 %, por ejemplo aproximadamente un 100 % tal como un 100 % a una concentración en el intervalo de 0,01 a 100  $\mu\text{M}$ , preferiblemente en el intervalo de 1 a 30  $\mu\text{M}$ , por ejemplo aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , tal como aproximadamente 8  $\mu\text{M}$ , por ejemplo aproximadamente 16  $\mu\text{M}$ , tal como aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ , por ejemplo aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 8  $\mu\text{M}$ .

Los compuestos preferidos de la invención son capaces de aumentar el tiempo de oclusión, concretamente, el tiempo después del cual se ocluye una arteria (0 % del flujo sanguíneo) tras la inducción de trombosis, que puede por ejemplo estar en contacto con un agente de promoción de la trombosis, por ejemplo,  $\text{FeCl}_3$ . Por tanto, tras la administración de un compuesto de la invención, aumenta el tiempo de oclusión antes de que una arteria se ocluya en comparación con el tiempo de oclusión si no se ha administrado compuesto. Aún más preferiblemente, el compuesto según la presente invención es capaz de aumentar el tiempo de oclusión en el modelo de trombosis de murino descrito en el Ejemplo 13 en este documento a continuación. Los compuestos preferidos de la invención son capaces de aumentar el tiempo de oclusión una media de al menos 7, preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9, aún más preferiblemente al menos 10 min. después de la administración de 100 mg/kg.

En formas de realización particularmente preferidas, los compuestos preferidos de la invención exhiben más de una de las propiedades descritas anteriormente en este documento.

#### **Afecciones clínicas**

La presente invención se refiere a procedimientos de tratamiento de afecciones clínicas que comprenden la administración de las sales antes mencionadas de los compuestos (preferiblemente cualquiera de los receptores de PPAR/TP o moduladores de la TS mencionados anteriormente, preferiblemente sales de cualquiera de los compuestos de fórmulas XI, XII, XIII o XIV, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico), así como a los usos de dichos compuestos y solvatos de los compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección clínica.

Los moduladores de PPAR descritos en este documento anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico), se pueden emplear en el control del peso. Por tanto, la afección clínica puede ser en una realización de un trastorno de la alimentación como anorexia nerviosa (también abreviado a "anorexia" en este documento) o bulimia. Los compuestos dados a conocer anteriormente en este documento (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico), también se pueden emplear en procedimientos para aumentar o disminuir el peso corporal, en particular para disminuir el peso corporal. La afección clínica puede ser por tanto la obesidad. La adiposidad es una acumulación excesiva de tejido graso. Investigaciones recientes han mostrado que los PPAR, en particular, PPAR-gamma, desempeñan un papel básico en la expresión génica y la diferenciación de los adipocitos. Los subtipos de PPAR-gamma están implicados en la activación de la diferenciación de adipocitos, pero desempeñan un papel menos importante en la estimulación de la proliferación de peroxisomas en el hígado. La activación de PPAR-gamma normalmente contribuye a la diferenciación de adipocitos mediante la activación de la expresión de genes específicos de adipocitos (Lehmann, Moore, Smith-Oliver, Wilkison, Willson, Kliewer, J. Biol. Chem., 270: 12953-12956, 1995. Por tanto, puede usarse un agonista de PPAR para obtener tejido graso. Los agonistas parciales de PPAR se pueden seleccionar por las propiedades útiles en el tratamiento de la acumulación excesiva de tejido graso.

En una realización preferida, la invención se refiere a procedimientos para el tratamiento de resistencia a la insulina mediante la administración de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en este documento (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) a un individuo necesitado del mismo. La invención también se refiere al uso de cualquiera de dichos compuestos (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la resistencia a la insulina. Además, la invención se refiere a procedimientos para aumentar la sensibilidad a la insulina mediante la administración de dichos compuestos (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico), así como al uso de dichos compuestos para la preparación de un medicamento para aumentar la sensibilidad a la insulina. Los trastornos agudos y transitorios en la sensibilidad a la insulina, tales como aquellos que pueden aparecer después de traumatismo, cirugía o infarto de miocardio, pueden tratarse como se enseña en este documento.

La resistencia a la insulina está implicada en una serie de afecciones clínicas. La resistencia a la insulina se

manifiesta por la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer su acción biológica a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones. Durante las etapas tempranas de resistencia a la insulina, el cuerpo secreta cantidades anormalmente altas de insulina para compensar este defecto. A pesar de que los niveles de insulina en la sangre son crónicamente altos, la alteración de la respuesta metabólica de las células musculares activas ante la insulina hace que sean incapaces de captar glucosa de manera efectiva. En la actualidad, se reconoce cada vez más que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia resultante pueden contribuir a varias afecciones clínicas, por ejemplo, al síndrome metabólico (también designado síndrome X). El síndrome metabólico se caracteriza por una primera etapa resistente a la insulina que provoca hiperinsulinemia, dislipidemia y reducción de la tolerancia a la glucosa. Los pacientes con síndrome metabólico se ha mostrado que tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y/o diabetes de tipo II.

Un paciente se dice que padece síndrome metabólico cuando se aplican al menos tres de los siguientes criterios:

- Obesidad central/abdominal medida por la circunferencia de la cintura (mayor de 102 cm en hombres y mayor de 94 cm en mujeres)

- Triglicéridos en ayunas superiores o iguales a 150 mg/dl (1,69 mmol/l)

- Colesterol HDL [Hombres - Menos de 40 mg/dl (1,04 mmol/l); Mujeres - Menos de 50 mg/dl (1,29 mmol/l)]

- Presión arterial superior o igual a 130/85 mm Hg

- Glucosa en ayunas mayor que o igual a 110 mg/dl (6,1 mmol/l)

La resistencia a la insulina también tiene un efecto negativo en la producción de lípidos, lo que contribuye al aumento de los niveles de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos en el torrente sanguíneo y a la disminución de HDL (lipoproteínas de alta densidad). Esto puede conducir a depósitos de placa grasa en las arterias que, con el tiempo, pueden conducir a aterosclerosis. Por tanto, la afección clínica según la presente invención puede ser I hiperlipidemia, tal como hiperlipidemia familiar. Preferiblemente, la hiperlipidemia se caracteriza por hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia. La afección clínica también puede incluir dislipidemia y dislipidemia diabética. Los compuestos incluidos en este documento (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3 -dioxan-5-il)hex-4-enoico) también se puede utilizar para disminuir los niveles de triglicéridos en suero o aumentar el nivel de HDL en plasma.

La resistencia a la insulina puede conducir a niveles excesivos de insulina y glucosa en la sangre. El exceso de insulina puede aumentar la retención de sodio por los riñones, por tanto los compuestos de la invención pueden emplearse para disminuir la retención de sodio por los riñones. Los niveles elevados de glucosa pueden dañar los vasos sanguíneos y los riñones. Por tanto, los compuestos de la invención pueden emplearse para prevenir el daño a los vasos sanguíneos y los riñones.

Otra afección clínica que puede estar mediada por PPAR-gamma es un trastorno inflamatorio. Se debe entender por el término "mediado por PPAR-gamma" que PPAR-gamma desempeña un papel en la manifestación de la afección. Por ejemplo, se considera que el PPAR-gamma no desempeña un papel en la inflamación asociada con la activación de neutrófilos, tal como inflamaciones agudas. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, los agonistas de PPAR-gamma pueden ser fármacos antiinflamatorios eficaces al asociarse directamente con e inhibir la transcripción medida por NFkB y por tanto la modulación de diversas reacciones inflamatorias tales como, por ejemplo, las rutas enzimáticas de óxido nítrico sintasa inducible (NOS ) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Pineda-Torra, I. et al., 1999, Curr. Opinion in Lipidology, 10, 151-9).

El trastorno inflamatorio puede ser agudo o crónico, tal como inflamación ocular (J Biol Chem. 28 de enero de 2000; 275 (4): 2837-44) o enfermedad del ojo seco (J Ocul Pharmacol Ther. diciembre de 2003; 19(6): 579-87, por ejemplo. Los ejemplos ilustrativos de trastorno inflamatorio crónico incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. El trastorno inflamatorio crónico también puede ser artritis, artritis reumatoide y poliartritis en particular. El trastorno inflamatorio crónico también podría ser una enfermedad inflamatoria de la piel, especialmente acné común, dermatitis atópica, trastornos cutáneos con disfunción de barrera, efectos cutáneos del envejecimiento o psoriasis, en particular psoriasis. El trastorno inflamatorio crónico también puede ser una enfermedad neurodegenerativa inflamatoria, tal como esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer. La afección clínica puede ser también enfermedades gastrointestinales y enfermedades renales, incluyendo glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, síndrome nefrítico y nefroesclerosis hipertensiva.

Otra afección clínica que puede ser sensible a la activación de PPAR-gamma es el cáncer. Por tanto, la afección clínica puede ser, por ejemplo, un trastorno caracterizado por un crecimiento celular aberrante de células sensibles a PPAR tales como trastornos hiperplásicos o neoplásicos que surgen en el tejido adiposo, tales como tumores de células adiposas, p. ej., lipomas, fibrolipomas, lipoblastomas, lipomatosis, hibemomas, hemangiomas y/o

liposarcomas. Además, se ha demostrado que ciertos tipos de cáncer de próstata, estómago, pulmón y páncreas son sensibles al tratamiento con agonistas de PPAR-gamma. En particular, se ha mostrado que ciertos liposarcomas, cánceres de próstata, mielomas múltiples y cánceres de páncreas son sensibles a la activación de PPAR-gamma, mientras que al menos algunos cánceres colorrectal y de mama no son sensibles (Rumi et al., 2004, Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents, 4: 465-77). Otros estudios han demostrado que otros tipos de cáncer de mama y colon son sensibles a los agonistas de PPAR, así como neuroblastoma y cánceres de vejiga. El uso de ligandos de PPAR para el tratamiento de cánceres se ha revisado por Levy Kopelovich, 2002, Molecular Cancer Therapeutics, 357.

10 Sin embargo, a pesar de que ciertos tipos de cáncer pueden ser sensibles a la activación con PPAR-gamma, pueden no ser sensibles todos los cánceres de un tipo dado. En particular, aparecen mutaciones de pérdida de función de PPAR-gamma con frecuencia en el cáncer, y dichos cánceres en general no son sensibles. Por tanto, se prefiere que el cáncer exprese PPAR-gamma funcional.

15 Otra afección clínica prevista en este documento es una infección, tal como una infección vírica, especialmente SIDA o infección por VIH o infección por el virus de la hepatitis C. Además, los ligandos de PPAR de la invención pueden ser útiles para mejorar las funciones cognitivas en enfermedades neurológicas o en demencia o para el tratamiento del síndrome del ovario poliquístico o para prevenir y tratar la pérdida de hueso, por ejemplo, osteoporosis.

20 Otra afección clínica prevista en este documento es una enfermedad hepática, especialmente infección por el virus de la hepatitis C, o hígado graso, inflamación hepática, lesiones hepáticas, cirrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica o cáncer poshepático, esté asociado o no con una infección por virus de la hepatitis C, pero preferiblemente sensible a la modulación de PPAR.

25 La afección clínica puede ser también el síndrome de Marfan.

Aunque gran parte de la descripción se ha relacionado con PPAR-gamma, los compuestos y usos de la invención no se limitan a la modulación de PPAR-gamma. De hecho, será evidente para el experto que otros subtipos de PPAR desempeñan un papel importante en la enfermedad. Además, es evidente para el experto en la técnica que también el receptor de tromboxano desempeña un papel importante en las enfermedades asociadas a PPAR. Por ejemplo, el PPAR-delta se ha asociado con trastornos del metabolismo lipídico y curación de heridas, en particular la curación de heridas epidérmicas (Soon Tan et al., 2004, Expert Opinion in Molecular Targets, 39). Por tanto, otra afección clínica prevista en este documento es la curación de heridas, incluyendo la curación de heridas epidérmicas.

35 Se han usado sensibilizadores de la insulina, por ejemplo, glitazonas, para tratar la resistencia a la insulina pero, al tiempo que mejoran la sensibilidad a la insulina, aumentan también en vez de disminuir el peso corporal. La obesidad y la inactividad física agravan la resistencia a la insulina. Las glitazonas, (tiazolidindionas o TZD) actúan mediante la mejora de sensibilidad a la insulina en tejido adiposo, hígado y músculo. Los tratamientos con dichos agentes se han probado en varios modelos animales de diabetes y han dado lugar a la corrección completa de los niveles plasmáticos elevados de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres no esterificados sin ningún aparición de reacciones de hipoglucemia (Cheng Lai y Levine, 2000, Heart Dis., 2, 326-333). Son ejemplos de estos las tiazolidindionas rosiglitazona, pioglitazona y troglitazona. Sin embargo, al tiempo que ofrecen efectos terapéuticos atractivos, estos compuestos padecen numerosos efectos secundarios indeseables graves, como hemo dilución (incluyendo edema), toxicidad hepática, aumento del peso corporal (incluyendo aumento de la grasa corporal por una mayor diferenciación de los adipocitos, aumento del volumen plasmático e hipertrofia cardíaca), aumento modesto pero significativo del LDL-colesterol y anemia (para una revisión, véase Lebovitz, 2002, Diabetes Metab. Res. Rev, 18, Supl. 2, S23-9). De hecho, una serie de tratamientos disponibles para la diabetes se asocia con aumento de peso, un problema de gran importancia para la gestión a largo plazo de la enfermedad. Por ello, hay mucha necesidad de agentes terapéuticos alternativos y más eficaces que se puedan usar en el tratamiento de

50 Por tanto, se prevé el tratamiento y/o la prevención simultáneos de obesidad y diabetes mediante la administración de los compuestos descritos en este documento (preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) a un individuo:

- i. que padece obesidad y diabetes, o
- ii. en riesgo de contraer diabetes y de volverse obeso, o
- 60 iii. que padece obesidad y en riesgo de contraer diabetes o
- iv. que padece diabetes y en riesgo de volverse obeso.

65 Por tanto, se prevé también el uso de los compuestos descritos en este documento (preferiblemente cualquiera de

los moduladores de PPAR descritos anteriormente, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) y los solvatos de los compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención simultáneos de obesidad y diabetes. Los compuestos pueden ser cualquiera de los compuestos descritos aquí anteriormente, preferiblemente cualquiera de los moduladores de PPAR descritos anteriormente, más preferiblemente cualquiera de los compuestos de las fórmulas XI, XII, XIII o XIV, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico. En esta realización, la diabetes es preferiblemente diabetes de tipo II. Dicho individuo en riesgo de contraer diabetes puede ser, por ejemplo, un individuo que padece el síndrome metabólico descrito anteriormente en este documento. Dicho individuo en riesgo de volverse obeso puede ser, por ejemplo, un individuo bajo tratamiento médico con un compuesto antidiabético que tiene el efecto secundario de aumento de peso.

Asimismo, se prevé el uso de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, más preferiblemente cualquiera de las sales de compuestos de fórmula XI, tales como de fórmula XII, por ejemplo de fórmula XIII, tales como de fórmula XIV, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, y los solvatos de los compuestos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención, preferiblemente el tratamiento de una afección clínica asociada con tromboxano en un individuo necesitado del mismo. La afección clínica puede ser una afección clínica caracterizada por aumento de la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y/o broncoconstricción. La afección clínica puede, por ejemplo, seleccionarse de entre el grupo que consiste en infarto de miocardio, trombosis, trastornos tromboticos, formación de trombos desencadenada por prótesis endovasculares, reestenosis inducida por prótesis endovasculares, hiperplasia desencadenada por prótesis endovasculares, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Kawasaki, defectos del septo ventricular, nefropatías de IgA, síndrome hepatorenal, fibrosis hepática, nefropatía diabética, retinopatía, retinopatía diabética, enfermedad arterial periférica, menor circulación en las extremidades, embolia pulmonar, formación de trombos, hiperplasia, choque séptico, preeclampsia, asma, rinitis, rinitis alérgica, angiogénesis y metástasis tumorales. La afección clínica relacionada con tromboxano (TP) también se puede seleccionar del grupo que consiste en infarto de miocardio, angina de pecho, angina inestable, accidente cerebrovascular, isquemia vascular cerebral transitoria, migraña, aterosclerosis, microangiopatía, hipertensión, defectos de coagulación de la sangre, situaciones de evitación de warfarina (por ejemplo, antes de cirugía), embolia pulmonar, asma bronquial, bronquitis, bronquitis crónica, neumonía, disnea y enfisema. En una realización preferida, la afección clínica se selecciona del grupo que consiste en trombosis, hipertensión pulmonar, nefropatía diabética, retraso de daño renal (en particular en pacientes diabéticos), retinopatía, enfermedad arterial periférica, menor circulación en las extremidades, formación de trombos, trombo formación desencadenada por prótesis endovasculares, restenosis inducida por prótesis endovasculares, hiperplasia desencadenada por prótesis endovasculares, choque séptico, preeclampsia, rinitis, rinitis alérgica, angiogénesis y metástasis tumorales, preferiblemente del grupo que consiste en trombosis, hipertensión pulmonar, nefropatía diabética, retinopatía, enfermedad arterial periférica, menor circulación en las extremidades, formación de trombos e hiperplasia. Los individuos resistentes a aspirina, clopidogrel, warfarina y otros medicamentos similares que actúan mediante diferentes mecanismos están particularmente beneficiados por el tratamiento con los compuestos descritos en este documento. Además, el individuo puede ser cualquier individuo que padece o está en riesgo de contraer cualquiera de las afecciones clínicas antes mencionadas asociadas con TP, preferiblemente el individuo es un ser humano que padece o tiene riesgo de contraer cualquiera de las afecciones clínicas antes mencionadas asociadas con TP, aún más preferiblemente dicho individuo es un ser humano que padece diabetes además de padecer o estar en riesgo de contraer cualquiera de las afecciones clínicas antes mencionadas asociadas con TP.

Se prevé el tratamiento de la trombosis en un individuo que ya tiene trombosis, ha padecido uno o más eventos tromboticos o padece uno o más eventos tromboticos, comprendiendo dicho procedimiento la administración de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, más preferiblemente una sal de cualquier de los compuestos de fórmulas XI, XII, XIII o XIV, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico a dicho individuo.

La invención también se refiere al uso de cualquiera de los compuestos específicos descritos anteriormente (preferiblemente cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, más preferiblemente cualquiera de las sales de los compuestos de fórmulas XI, XII, XIII o XIV, tales como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección clínica. La afección clínica se puede seleccionar del grupo que consiste en síndrome metabólico, dislipidemia, obesidad, diabetes mellitus, resistencia a la insulina o cualquiera de las afecciones relacionadas con la resistencia a la insulina descritas anteriormente, hipertensión, enfermedad cardiovascular, reestenosis de arteria coronaria, enfermedades autoinmunes (tales como asma, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis tópica, y colitis ulcerosa), cáncer, inflamación, curación de heridas, trastornos del metabolismo lipídico, enfermedad hepática (tal como infección por el virus de la hepatitis C, o hígado graso, inflamación hepática, lesiones hepáticas, cirrosis hepática o cáncer poshepático asociado o no con una infección por el virus de la hepatitis C), enfermedad gastrointestinal o renal (tal como glomerulonefritis, glomerulosclerosis, síndrome nefrítico, o nefrosclerosis hipertensiva), infección (en particular infección vírica), trastornos de la función cognitiva (por ejemplo, trastornos neurológicos o demencia), síndrome del ovario poliquístico, pérdida ósea (tal como osteoporosis) y SIDA.



El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, por ejemplo cualquiera de los siguientes: carcinomas, sarcomas, osteosarcoma, leucemias y linfomas; angiogénesis y metástasis tumorales; displasia esquelética; trastornos hepáticos y trastornos hematopoyéticos y/o mieloproliferativos. Los trastornos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervicouterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, o retinoblastoma. Preferiblemente, el cáncer es uno de los cánceres mencionados anteriormente sensibles a la activación de PPAR-gamma.

Las enfermedades cardiovasculares pueden ser, por ejemplo, aterogénesis, aterosclerosis o trastornos ateroscleróticos, reestenosis vascular, cardiomiopatía, o fibrosis de miocardio, o cualquiera de las enfermedades cardiovasculares mencionadas anteriormente.

La inflamación puede ser, por ejemplo, una inflamación crónica, preferiblemente cualquiera de las inflamaciones crónicas mencionadas en este documento anteriormente.

La diabetes sacarina hace referencia a un proceso patológico derivado de múltiples factores causantes y caracterizado por niveles elevados de glucosa en la sangre, o hiperglucemia. La hiperglucemia no controlada se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad prematura. Se han identificado al menos dos tipos de la diabetes mellitus: (i) diabetes de tipo I, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), que es el resultado de una completa falta de insulina, la hormona que regula la utilización de glucosa en condiciones fisiológicas normales, y (ii) la diabetes de tipo II o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM). La DMNID es una enfermedad compleja derivada de múltiples factores causantes, los cuales pueden abordarse en algunos casos mediante el aumento de los niveles circulantes de insulina.

#### **Formulaciones coadyuvantes y procedimientos de administración**

De acuerdo con los usos y composiciones de la presente invención, se pueden administrar uno o más de los compuestos descritos en este documento (preferiblemente un modulador de PPAR, un antagonista de TP y/o inhibidor de la TS descrito anteriormente, tal como ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) a un mamífero en una variedad de formas dependiendo de la vía de administración seleccionada, como será entendido por los expertos en la técnica. Las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, nasal, tópica, mediante administración pulmonar o parenteral, incluyendo esta última vía la administración intravenosa y subcutánea. La administración parenteral puede ser por infusión continua durante un período de tiempo seleccionado.

Las formas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad.

Para facilitar la administración por el paciente, se prefieren modos de administración orales u otros no invasivos, por ejemplo, parches, supositorios y similares. Los compuestos se pueden administrar por vía oral con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, puede incorporarse un compuesto activo con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares.

Las composiciones que contienen uno o más compuestos de la presente invención también se pueden administrar en una solución o emulsión contenida dentro de vesículas de fosfolípidos llamadas liposomas. Los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares y están formados por constituyentes seleccionados entre fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, dimiristoilfosfatidilcolina y combinaciones de los mismos. Los liposomas multilamelares comprenden vesículas multilamelares de composición similar a las vesículas unilamelares, pero se preparan de manera que den lugar a una pluralidad de compartimentos en los que se atrapan los compuestos en solución o emulsión. Adicionalmente, pueden incluirse otros adyuvantes y modificadores en la formulación liposómica tales como polietilenglicol u otros materiales.

Las composiciones que contienen liposomas también pueden tener modificaciones tales como tener anticuerpos inmovilizados sobre la superficie del liposoma con el fin de orientar su suministro.

Es una realización de la presente invención una composición farmacéutica para administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo* para el tratamiento de una de las afecciones clínicas descritas anteriormente en la sección "Afecciones clínicas", comprendiendo dicho procedimiento una cantidad segura y eficaz de un compuesto solo, o en combinación con otros agentes y/o vehículos farmacéuticos. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse para tratar resistencia a la insulina y/o diabetes en combinación con un agente efectivo contra la dislipidemia, tal como un fármaco de la clase de fibratos, por ejemplo, bezafibrato. Son ejemplos de otros agentes sensibilizadores de la insulina, agonistas de PPAR $\gamma$ , glitazonas, troglitazona, pioglitazona, englitazona, MCC-555, BRL 49653, biguanidas, metformina, fenformina, insulina, miméticos de insulina, sulfonilureas, tolbutamida, glipizida, inhibidores de alfa-glucosidasa, acarbosa, agente reductor del colesterol, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atrovastatin, rivastatina, otras estatinas, sequestrantes, colestiramina, colestipol, derivados de dialquilaminoalquilo de un dextrano reticulado, alcohol nicotínico, ácido nicotínico: una sal de ácido nicotínico, agonistas de PPAR-alfa, derivados del ácido fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato, fenofibrato, inhibidores de la absorción de colesterol, beta-sitosterol, inhibidores de la acril CoA: colesterol aciltransferasa, melinamida, probucol, agonistas de PPAR-delta, compuestos antiobesidad, fenfluramina, dexfenfluramina, fentiramina, sulbitramina, orlistat, inhibidores de neuropéptido Y5, agonistas de receptor adrenérgico  $\beta_3$  e inhibidores del transportador ileal de ácidos biliares.

La composición puede administrarse a cualquier organismo vivo necesitado de dicho tratamiento, incluyendo seres humanos y animales ya que la composición tiene eficacia *in vivo*. Se entiende por seguro y eficaz, como se usa en este documento, que proporciona suficiente potencia con el fin de disminuir, prevenir, mejorar o tratar la enfermedad que afecta al sujeto mientras se evitan los efectos secundarios graves. La cantidad segura y eficaz variará dependiendo de la edad del sujeto, la condición física del sujeto que se está tratando, la gravedad del trastorno, la duración del tratamiento y la naturaleza de cualquier terapia concurrente, y su determinación está dentro de las habilidades del médico común. Las composiciones se formulan y administran de la misma manera general que se describe en este documento. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar eficazmente solos o en combinación con al menos un agente activo adicional. La terapia de combinación incluye la administración de una formulación de dosificación farmacéutica individual que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración del compuesto de la presente invención, y cada agente activo tiene su propia formulación de dosificación farmacéutica independiente. Por ejemplo, un compuesto de la invención y un secretagogo de insulina, tales como sulfonilureas, tiazolidindionas, biguanidas, meglitinidas, insulina o inhibidores de beta-glucosidasa, se pueden administrar al paciente juntos en una composición de dosificación oral individual, tal como una cápsula o comprimido, o se pueden administrar cada agente en dosificaciones orales separadas. Cuando se usan dosificaciones independientes, se pueden administrar un compuesto de la presente invención y uno o más agentes activos adicionales esencialmente al mismo tiempo, concretamente de forma concurrente, o por separado en momentos escalonados, concretamente, de forma secuencial; se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención puede variar también según factores tales como el estado patológico, la edad, sexo y peso del sujeto y la capacidad del compuesto de desencadenar una respuesta deseada en el sujeto. Se pueden ajustar los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir de forma proporcional según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

Una dosis de alrededor de 0,01 mg/kg es probablemente una dosificación inicial adecuada para un mamífero, y esta dosificación se puede ajustar según sea necesario para proporcionar una cantidad segura y eficaz. Por tanto, la dosificación será inicialmente típicamente de 0,01 a 100 mg/kg, tal como de 0,1 a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg, preferiblemente de 0,5 a 5 mg/kg, más preferiblemente 1 a 5 mg/kg. Para un ser humano adulto, la dosis será en general de 0,01-20 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente 0,5 a 5 mg/kg, tal como en el intervalo de 1 a 200 mg en total, por ejemplo 1 a 125 mg en total, por ejemplo 5 mg en total, administrada preferiblemente una vez o dos veces al día.

Se entiende por vehículo farmacéuticamente aceptable como se utiliza en este documento, uno o más sistemas de suministro compatibles sólidos o líquidos que tienen reacciones fisiológicas inocuas cuando se administran a un sujeto. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa y sus derivados, tragacanto en polvo, malta, gelatina, colágeno, talco, ácidos esteárico, estearato de magnesio, sulfato de calcio, aceites vegetales, polioles, agar, ácidos algínicos, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, tampón fosfato y otras sustancias no tóxicas adecuadas usadas en formulaciones farmacéuticas. Se contemplan también otros excipientes tales como agentes humectantes y lubricantes, agentes de formación de comprimidos, estabilizadores, antioxidantes y conservantes.

Las composiciones descritas en este documento se pueden preparar mediante procedimientos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de tal manera

que se combina una cantidad eficaz de los compuestos o análogos en una mezcla con un vehículo farmacéutico aceptable. Los vehículos adecuados se describen por ejemplo en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE.UU., 1985). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de los compuestos en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticos aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de la invención (preferentemente el modulador de PPAR, antagonista del receptor TP y/o inhibidor de la TS), tales como cualquiera de las sales de los compuestos de fórmula XI, por ejemplo cualquiera de los compuestos de fórmula XII, tales como cualquiera de los compuestos de fórmula XIII, tales como cualquiera de los compuestos de fórmula XIV, por ejemplo ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico son para administrar en mezcla con excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticos adecuados, en particular, con excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticos adecuados para la liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, dual y controlada o el suministro por pulsos de dichos compuestos.

Por ejemplo, los compuestos que se usan de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas (incluyendo cápsulas de gel blando), óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, dual o controlada o de suministro por pulsos. Los compuestos de la invención también se pueden administrar a través de formas de dosificación de dispersión rápida o de disolución rápida. En una realización preferida de la invención, los compuestos (preferiblemente el modulador de PPAR, antagonista del receptor TP y/o inhibidor de la TS, tales como cualquiera de las sales de los compuestos de fórmula XI, por ejemplo cualquiera de los compuestos de fórmula XII, tales como cualquiera de los compuestos de fórmula XIII, como cualquiera de los compuestos de fórmula XIV, por ejemplo ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) se administran en una composición farmacéutica para liberación retardada, modificada, sostenida o controlada.

Las formas de dosificación de liberación retardada, modificada, sostenida o controlada pueden contener los excipientes mencionados anteriormente junto con excipientes adicionales que actúan como modificadores de la tasa de liberación, estando éstos recubiertos sobre y/o incluidos en el cuerpo del dispositivo. Los modificadores de la tasa de liberación incluyen, pero no se limitan exclusivamente a, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, celulosa acetato, poli(óxido de etileno), goma de xantano, Carbomer, copolímero de metacrilato de amonio, aceite de ricino hidrogenado, cera de carnauba, cera de parafina, celulosa acetato ftalato, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, copolímero de ácido metacrílico, Cremophor, glicérido de aceite de maíz, propilenglicol y mezclas de los mismos. Las formas de dosificación de liberación modificada y de liberación controlada pueden contener uno o una combinación de excipientes modificadores de la tasa de liberación. Los excipientes modificadores de la tasa de liberación pueden estar presentes tanto dentro de la forma de dosificación, concretamente, dentro de la matriz, y/o en la forma de dosificación, concretamente, sobre la superficie o recubrimiento.

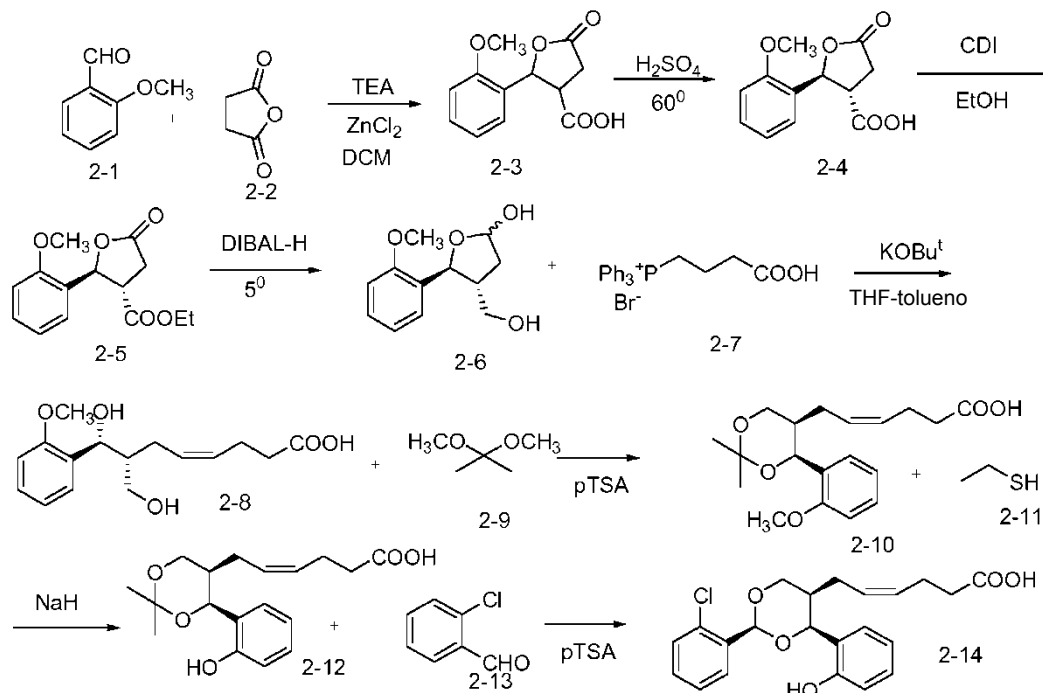
Además de las formulaciones descritas anteriormente, los medicamentos que contienen un compuesto para uso de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar además mediante técnicas convencionales, por ejemplo como se describe en Remington: "The Science and Practice of Pharmacy" 1995, editado por W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pa.

Los siguientes ejemplos describen aspectos específicos de la invención para ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes de la invención, ya que los ejemplos simplemente proporcionan metodología específica útil en la comprensión y la práctica de la invención.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1 Síntesis de ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico.**

Este ejemplo describe la síntesis de ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, también denominado en este documento como DPD, según el Esquema 2 (SN1 en la Tabla II).

**Esquema 2**

5

**Síntesis de ácido 2-metoxiparaconico racémico (2-3) como una mezcla *cis/trans*:**

Se cargó un reactor de vidrio de doble camisa de 20 litros con 260 g de o-metoxibenzaldehído, 286 g de anhídrido succínico, 572 g de cloruro de zinc anhidro y 2600 ml de DCM anhidro. Se agitó la mezcla y se enfrió a 2 °C. Se añadió una cantidad de 533 ml de trietilamina durante un período de 30 min. Se dejó entonces la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió una cantidad de 1690 ml de HCl 2 M, seguido por 2600 ml de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente la mezcla durante 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa con 2000 ml de acetato de etilo. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con 650 ml de salmuera saturada, seguido de un lavado con 3 x 2600 ml de bicarbonato de sodio saturado. Después se lavaron los extractos acuosos combinados con acetato de etilo. Se acidificaron los extractos acuosos a pH 2 usando HCl concentrado. Se separó un aceite amarillo. Se extrajo la mezcla dos veces usando 2000 ml de acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica cuatro veces con 1000 ml de salmuera y se evaporó en un rotavapor Buchi R220 empleando una temperatura del baño de calentamiento de 45 °C. Para los residuos restantes, se añadieron 4000 ml de tolueno. Se calentó la mezcla a 110 °C. Se separó por destilación 1 l de tolueno. El resto se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dejó en reposo durante 48 horas, durante el cual cristalizó ácido 2-metoxiparaconico puro. Se recogió el material cristalino, se filtró y se secó a vacío a 45 °C en una estufa de vacío hasta peso constante.

**Rendimiento:** 220 g (49 %). Relación *cis/trans*: 46/54.

**25 Conversión del ácido metoxiparaconico racémico *cis* y *trans* en ácido *todo-trans*-2-metoxiparaconico (2-4):**

Se añadieron 1020 g de ácido metoxiparaconico a una mezcla de 1729 ml de ácido sulfúrico concentrado y 2.570 ml de agua. Se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se obtuvo una relación *cis/trans* de 33:64. Se calentó entonces la mezcla a 60 °C durante 2,5 h. Se obtuvo una relación *cis/trans* de 11:89 (análisis por HPLC). Se dejó enfriar entonces la mezcla a temperatura ambiente y se filtró posteriormente. Se redisolvió el material sólido en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó. Se observó una relación *cis/trans* de 6:94. El material sólido se recrystalizó en tolueno caliente. El material cristalino obtenido se secó a vacío a 40 °C durante 48 h.

**35 Rendimiento:** 855 g (84%). Relación *cis/trans*: 8/92. Punto de fusión: 132-133 °C

RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 2,9 (2H, d), 3,4 (1H, m), 3,83 (3H, s), 5,85 (1H, d), 6,8-7,4 (4H, m)

**40 Esterificación del ácido metoxiparaconico racémico, (2-5):**

Se disolvieron 193 g de ácido metoxiparaconico en 600 ml de THF. Se añadieron a la mezcla 145 g de CDI (899

mmol, 1,1 eq) y se agitó la mezcla durante 10 min. Se añadió una cantidad de 65 ml de etanol absoluto (o metanol para elaborar el éster de metilo) y se agitó la mezcla hasta terminación (~ 120 min).

5 Se extrajo la mezcla de reacción bruta usando acetato de etilo y bicarbonato de sodio saturado. Se lavó la fase orgánica con HCl 0,5 N y salmuera. Después de la evaporación, se obtuvo una cantidad de 188 g del éster etílico.

#### **Reducción de éster etílico del ácido metoxiparacónico racémico (2-6):**

10 Preparación de lactol racémico: Se añadieron a 105 g de éster etílico (397 mmol) en 700 ml de tolueno a 5 °C 3 eq. de DIBAL-H (1,19 mol, 1,19 l de solución 1 M). Se agitó la mezcla durante 60 minutos a temperatura ambiente y se inactivó con metanol. Se añadieron acetato de etilo (2,5 L) y agua (700 ml). Después de la separación de fases, se extrajo de nuevo la fase acuosa con AcOEt. Se lavó entonces la fase orgánica con salmuera, se filtró y se evaporó. Se recristalizó el residuo oleoso en cloroformo/hexanos. Se filtraron los sólidos y se secaron a vacío.

15 **Rendimiento:** 53 g (237 mmol, 59 %).

#### **Reacción de Wittig que emplea lactol racémico-Síntesis del diol racémico (2-8):**

20 Se mezclaron una cantidad de 191 g de bromuro de carboxipropiltrifenilfosfonio, 1.000 ml de tolueno anhidro y 100 g de terc-butóxido potásico a 80 °C durante 30 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una cantidad de 25 g de lactol purificado racémico (114,5 mmol) predisoluto en 180 ml de THF anhidro. Se continuó la reacción durante 60 min. Se vertió la mezcla de reacción bruta en 1500 ml de agua con hielo, se añadieron 300 ml de acetato de etilo. Se reextrajo la fase acuosa con 300 ml de acetato de etilo. Se acidificó entonces la fase acuosa con HCl 2 N y se extrajo 3 veces usando 300 ml de acetato de etilo. Los sólidos que se habían formado se separaron por filtración. Se evaporó la solución orgánica. Se añadieron al residuo evaporado 500 ml de dietiléter. Se dio vueltas al matraz durante 10 min y los sólidos se separaron por filtración. Se extrajo el filtrado 3 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio. Se acidificó entonces la fase acuosa a pH 4 usando HCl 2 M. Se extrajo entonces la fase acuosa 3 veces empleando 200 ml de acetato de etilo. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron procurando 45 g de material.

30 **Cromatografía en columna:**

35 Se purificó el diol racémico sobre gel de sílice (35 cm de longitud de la columna, 4 cm de diámetro). Se disolvió el diol racémico en un mínimo de acetato de etilo y se aplicó a la columna. Se añadió 1 l de acetato de etilo (60 %)/hexanos (40 %) se añadió a un cilindro volumétrico. Se tomaron 300 ml de AcOEt/hexanos del cilindro y se añadieron a la columna. Se diluyeron los 700 ml restantes de AcOEt/hexanos en el cilindro a 1 l usando acetato de etilo. Se añadieron entonces 300 ml de la nueva solución de AcOEt/hexanos a la columna y se dejó pasar a través de la columna. Se diluyeron de nuevo los 700 ml restantes de AcOEt/hexanos en el cilindro a 1 l usando acetato de etilo. Se añadieron entonces 300 ml de la nueva solución de AcOEt/hexanos a la columna y se dejó pasar a través de la columna. Se diluyeron una vez más los 700 l restantes de AcOEt/hexanos en el cilindro a 1 l usando acetato de etilo. Se añadieron entonces 300 ml de la nueva solución de AcOEt/hexanos a la columna y se dejó pasar a través de la columna. Se recogieron las fracciones puras de diol racémico y se evaporaron, procurando 26 g de diol racémico puro.

45 **Rendimiento:** 26 g (88,3 mmol, 79 %)

#### **Conversión del diol racémico en acetónido racémico (2-10):**

50 Se mezclaron 26 g (88 mmol) de diol purificado con 260 ml de dimetoxipropano y 26 mg de p-TsOH. Se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron tres gotas de trietilamina y se evaporó la mezcla. Se añadieron al residuo restante 150 ml de hexano y se agitó la mezcla durante la noche. Se separaron los sólidos por filtración y se secaron, procurando 25 g (75 mmol) de acetónido racémico.

55 **Rendimiento:** 85 %

#### **Desmetilación de acetónido racémico (2-12):**

60 Se preparó una suspensión de hidruro de sodio y etanotiol añadiendo 16,7 g de etanotiol a una mezcla de 21,5 g de NaH en 375 ml de DMPU. Se calentó la suspensión a 80 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

65 Se disolvieron 15 g de acetónido racémico en 75 ml de DMPU y se añadieron a la suspensión de EtSH/NaH. Se calentó la mezcla hasta 130 °C durante 2 h. Se vertió entonces la mezcla de reacción en agua con hielo y se extrajo con DCM. Se acidificó la fase acuosa usando HCl 2 N y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica se lavó con salmuera y se evaporó hasta sequedad.

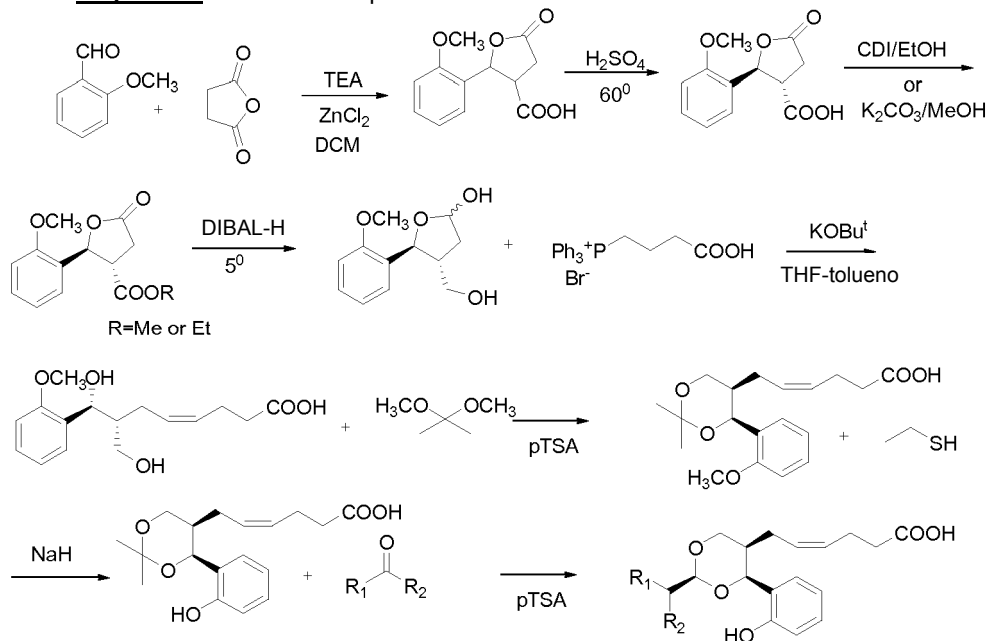
**Rendimiento:** 16,5 g (bruto).

**Preparación del compuesto final racémico (2-14):**

5 Se mezcló una cantidad de 28 mmol acetónido desmetilado racémico con 15 ml de 2-clorobenzaldehído, 0,5 g de p-TsOH, y 60 ml de tolueno. Se agitó la mezcla durante 24 h y se evaporó. Se purificó la mezcla de reacción bruta usando cromatografía en gel de sílice empleando un instrumento de cromatografía Biotage Horizon®. Se purificó la mezcla usando DCM (19)/metanol (1), procurando 6,5 g de un sólido después de la evaporación.

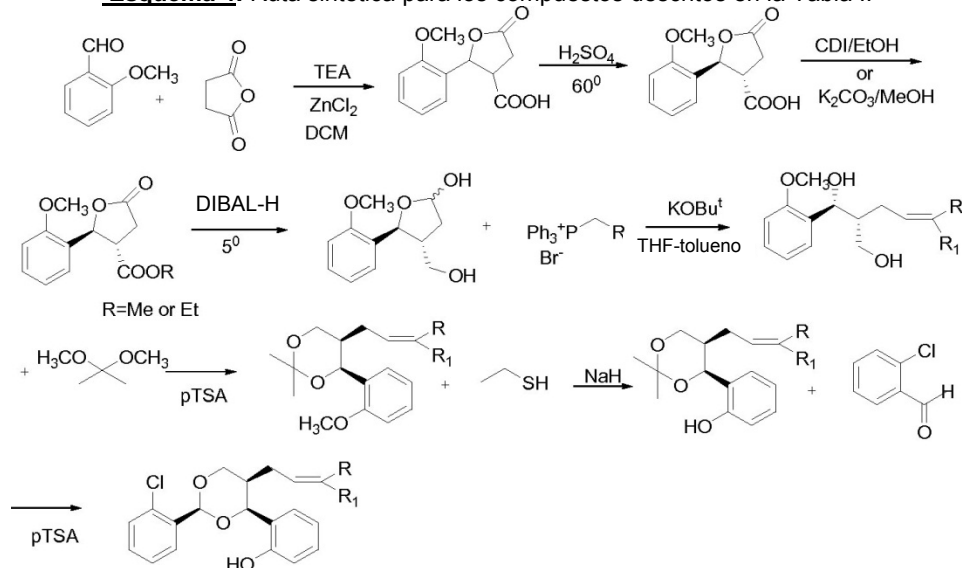
10 **Rendimiento:** 6,5 g (16,7 mmol, 59 %)

**Esquema 3:** Ruta sintética para moduladores de PPAR descritos en la Tabla II



15

**Esquema 4:** Ruta sintética para los compuestos descritos en la Tabla II



**Ejemplo 2 Ensayos de transactivación de PPAR-gamma**

20 **Cultivo de células, plásmidos y transfecciones**

Este es un ejemplo de un ensayo de transactivación para determinar la actividad moduladora de PPAR-gamma.

Se usaron Gal4-PPAR-gammaLBD (Helledie et al 2000), UASx4-TK luc (Chen y Evans, 1995) y CMV-beta-galactosidasa (disponible comercialmente, por ejemplo, en Clontech) en estos ensayos para mostrar la transactivación PPAR-gamma. El constructo indicador UASx4-TK-luc (donde UAS hace referencia a "secuencia activadora en 5'") contiene cuatro elementos sensibles a Gal4. El plásmido Gal4-PPAR-gammaLBD codifica una proteína de fusión Gal4-DBD-PPARgamma-LBD (concretamente, el dominio de unión a ADN, DBD, de Gal4 fusionado con el dominio de unión a ligando, LBD, de PPAR-gamma) capaz de transactivar el plásmido indicador UASx4-TK-luc mediante la unión a UAS. El plásmido CMV-beta-galactosidasa (donde CMV es citomegalovirus) se usa para la normalización de los valores experimentales.

Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en medio basal Amniomax (Gibco) suplementado con 7,5 % de suplemento Amniomax C-100 (Gibco), 7,5 % de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, penicilina 62,5 mg/ml y estreptomina 100 mg/ml (medio de crecimiento). Como alternativa, se cultivaron células ME3 (Hansen et al., 1999) en DMEM suplementado con suero de ternero (CS) al 10 %, penicilina 62,5 mg/ml y estreptomina 100 mg/ml (medio de crecimiento). Se volvieron a sembrar las células, típicamente en placas de 24 pocillos, de modo que en el momento de la transfección las células sean de 50 a 70 % confluentes.

Se transfectaron las células con Gal4-PPARgammaLBD (Helledie et al 2000), UASx4-TK luc (Chen y Evans, 1995) y CMV-beta-galactosidasa (disponible comercialmente, por ejemplo, en Clontech) usando Lipofectamin Plus (Invitrogen) o Metafectane (Biontex) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclan por pocillo en una placa de 24 pocillos, UASx4TKluc (0,2 µg) Gal4-PPARgammaLBD (o pM-hPPARgamma-LBD; 0,1 µg) y CMV-beta-galactosidasa (0,05 mg) en 30 µl de DMEM (sin suero y antibióticos) con 30 µl de DMEM (sin suero y antibióticos) que contiene 1 µl de metafecteneína. Se incubaba la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min para permitir la formación de complejos de ácido nucleico-lípido y entonces se añaden aproximadamente 60 µl a cada pocillo que contiene las células confluentes al 50-60 %. Se incuban entonces las células a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 6 a 12 horas y se sustituye entonces el medio por medio suplementado con antibióticos y la sustancia de interés (por ejemplo, ácido 4-(Z)-6-(2-o-clorofenil-4-o-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hexenoico, al que se hace referencia en este documento como DPD, o rosiglitazona (Avandia) como control positivo, todo disuelto en DMSO) o un volumen comparable de DMSO (<0,5 % del volumen de cultivo celular total). El DPD está disponible comercialmente o puede sintetizarse según el ejemplo 1. Se recogieron células después de 12-24 horas y se midieron las actividades de luciferasa y beta-galactosidasa según protocolos estándares.

La transactivación de PPAR era más de 40 veces más alta con rosiglitazona (un agonista de PPAR-gamma conocido) que con DMSO solo, y aproximadamente 10 veces más alta con ácido 4-(Z)-6-(2-o-clorofenil-4-o-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hexenoico 10 mM (véase "DPD" en la fig. 2). Así, el ácido 4-(Z)-6-(2-o-clorofenil-4-o-hidroxifenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hexenoico es un agonista de PPAR-gamma.

Los resultados preliminares indicaron que no había diferencia en la actividad de transactivación de PPAR-gamma entre cualquiera de los enantiómeros de DPD purificados por HPLC quiral. Sin embargo, el posterior análisis ha puesto de manifiesto una diferencia significativa (véase el Ejemplo 12 en este documento a continuación). Por tanto, se encontró que un enantiómero no se unía a PPAR<sub>γ</sub>, mientras que el otro se une a PPAR con una CI<sub>50</sub> en el intervalo de 4,9 a 12 µM.

La Tabla II resume los resultados obtenidos con varios análogos de DPD (SN1) y compara sus actividades. "P" representa una actividad activadora de PPAR-gamma similar a 10 µM en comparación con DPD 10 µM (SN1 en la Tabla II), "P-" representa el mismo nivel de actividad en sustancia ensayada 30 µM en comparación con DPD 10 µM (concretamente, menos potente); "P +" representa un nivel de actividad mayor que "P" y un nivel de actividad a 3 µM comparable con DPD 10 µM (concretamente, más potente); "P ++" representa un nivel de actividad a 3 µM por encima del de DPD 10 µM pero a 1 µM por debajo del de DPD 10 µM y "P +++" representa un nivel de actividad a 1 µM comparables con DPD 10 µM. "-" significa que no se realizó la prueba.

Cuando este ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe anteriormente, pero con PPAR-gamma humano completo en lugar de con el dominio de unión a ligando de PPAR-gamma, se observó activación de hPPARγ2 completo a un 64 % del control positivo de Avandia (Fig. 3).

### Ejemplo 3 Ensayos de transactivación de PPAR-delta

Este ejemplo describe un ensayo de transactivación para determinar la actividad de modulación de PPAR-delta.

Se prueba la capacidad de DPD y otros ligandos de transactivar PPAR-delta esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, el constructo de transactivación es mPPARdeltaLBD, en el que el dominio de unión a ligando de PPAR-delta sustituye a PPAR-gamma y se usa L165041 (disponible comercialmente) como agonista selectivo de PPAR-delta en lugar de rosiglitazona. En las condiciones utilizadas, se ha mostrado que L165041 aumenta la transactivación de PPAR-delta en más de 50 veces, mientras que el DPD dio lugar a poco o ningún aumento de transactivación (véase la fig. 2). Por lo tanto, el DPD muestra selectividad por PPAR-gamma. Cuando este ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe anteriormente, pero con PPAR-delta humano completo

en lugar de con el dominio de unión a ligando de PPAR-delta, no se observó activación de hPPARdelta completo (Fig. 4), lo que confirma la selectividad de DPD por PPAR-gamma.

#### 5 **Ejemplo 4 Ensayos de transactivación de PPAR-alfa**

Este ejemplo describe un ensayo de transactivación para determinar la actividad moduladora de PPAR-alfa.

Se prueba en DPD y otros ligandos su capacidad para transactivar PPAR-alfa esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, el constructo de transactivación es mPPARalphaLBD, en el que el dominio de unión a ligando de PPAR-alfa sustituye a PPAR-gamma y se usa GW7647 (disponible comercialmente) como agonista selectivo de PPAR-alfa en lugar de rosiglitazona. En las condiciones usadas, se ha mostrado que GW7647 aumenta la transactivación de PPAR-alfa en más de 2 veces, mientras que el DPD no dio lugar a transactivación (véase la fig. 2). Por lo tanto, el DPD muestra selectividad por PPAR-gamma.

#### 15 **Ejemplo 5 Ensayo de transactivación de RXR**

Este ejemplo describe un ensayo de transactivación del receptor de ácido retinoico X.

Se ensayó en los compuestos su capacidad de transactivar RXR esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, el constructo de transactivación era hRXRaLBD, en el que el dominio de unión a ligando de RXR sustituye a PPAR-gamma y se usa ácido {4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]benzoico} (LG1069, disponible comercialmente) como agonista selectivo de RXR en lugar de rosiglitazona. En las condiciones usadas, se muestra que LG1069 aumenta la transactivación de RXR transactivación en más de 5 veces, mientras que el DPD no dio lugar a transactivación (véase la fig. 2). Por lo tanto, el DPD muestra de nuevo selectividad por PPAR-gamma.

#### 30 **Ejemplo 6 Ensayos de diferenciación de adipocitos**

Este ejemplo describe un ensayo para determinar la diferenciación de adipocitos. Los compuestos se prueban para ver si inducen la diferenciación de adipocitos y también para ver si inhiben la diferenciación de adipocitos.

##### **Cultivo celular y diferenciación**

Se cultivaron MEF en medio basal Amniomax (Gibco) suplementado con suplemento Amniomax C-100 (Gibco) al 7,5 %, suero fetal bovino (FBS) al 7,5 %, glutamina 2 mM, penicilina 62,5 µg/ml y 1estreptomycinina 100 mg/ml (medio de crecimiento). A confluencia, se indujeron a diferenciación MEF en medio de crecimiento con la adición de dexametasona 1 µM (Sigma), isobutilmetilxantina 0,5 µM (Sigma), insulina 5 µg/ml (Sigma) y compuesto de ensayo 10 µM disuelto en DMSO o DMSO solo. El medio se renovó posteriormente cada 48 horas con medio de crecimiento suplementado con insulina 5 µg/ml y ligando o DMSO.

Brevemente, para probar compuestos como inductores de la diferenciación de adipocitos, se cultivan 3T3-L1 hasta la confluencia en DMEM con suero de ternera (CS) al 10 %, típicamente en discos de 24 pocillos. A los 2 días después de la confluencia (día 0), se inducen células a diferenciación con DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, dexametasona 1 µM y el compuesto de ensayo (0,1, 1 y 10 µM ). Se usa BRL49653 (1,0 µM disuelto en DMSO al 100 %) como control positivo. Después de 48 h, las células se volvieron a alimentar con DMEM que contiene FBS al 10 % suplementado con el compuesto de ensayo o el control positivo. A partir del día 4, se cultivan las células DMEM con FBS al 10 % y se cambian cada dos días hasta el día 8. En el día 8, las células se tiñeron con aceite rojo O como se describe a continuación.

Para probar los compuestos como inhibidores de la diferenciación de adipocitos, se cultivan células 3T3-L1 como anteriormente hasta postconfluencia de dos días (designado día 0), después de lo cual se inducen las células a diferenciación con DMEM que contiene suero fetal bovino (FBS) al 10 %, dexametasona 1 µM (Sigma), metilisobutilxantina 0,5 mM (Sigma), insulina 1 µg/ml (Roche Molecular Biochemicals) y el compuesto de ensayo. Se usan como control positivo células inducidas a diferenciarse en presencia de disolvente de los compuestos de ensayo. Después de 48 h, se realimentaron las células con DMEM que contiene FBS al 10 % suplementado con el compuesto de ensayo o el control positivo. A partir del día 4, se cultivan las células en DMEM con FBS al 10 % y se cambian cada dos días hasta el día 8. En el día 8, se tiñen las células con aceite rojo O como se describe a continuación.

##### 60 **Tinción con aceite rojo O**

Se usan células cultivadas como se ha descrito anteriormente para la tinción con aceite rojo. Se lavan los discos con PBS, se fijaron las células con paraformaldehído al 3,7 % durante 1 h y se tiñeron con aceite rojo O como se describe en (Hansen et al 1999). Se prepara la solución madre de solución de aceite rojo O disolviendo 0,5 g de aceite rojo O (Sigma) en 100 ml de isopropanol. Se prepara la solución de trabajo de aceite rojo O diluyendo una



solución madre con agua (6: 4), seguido de filtración.

El DPD inducía muy poca tinción con rojo en el ensayo de inducción. Como la tinción roja es indicativa de la presencia de adipocitos, se puede inferir que el DPD no induce la diferenciación de adipocitos. Sin embargo, el DPD no inhibe los adipocitos, ya que no mostró ningún efecto significativo en la inhibición de la diferenciación de adipocitos. La Tabla II resume los resultados obtenidos con diferentes análogos de DPD (SN1), "0" representa resultados similares a DPD, "-1" representa aún menos diferenciación de adipocitos, "1" representa más diferenciación de adipocitos (ambos en relación con DPD) y "-S" significa no ensayado.

Un ensayo llevado a cabo esencialmente como se describió anteriormente, pero utilizando preadipocitos humanos, también demostró que el DPD inducía muy poca tinción roja, similar a DMSO.

#### **Ejemplo 7 Identificación de agonistas parciales frente a agonistas completos**

Este ejemplo describe un ensayo para determinar agonistas de PPAR parciales, que son particularmente deseables como productos farmacéuticos.

Brevemente, se llevan a cabo ensayos de transactivación esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 pero se añade Avandia 100 nM (un agonista total) a cada pocillo, junto con concentraciones crecientes de compuesto de ensayo (o sin compuesto de ensayo como control). Los compuestos que reducen la transactivación por Avandia son agonistas parciales de PPAR. Los resultados se representan en la Fig. 5

Los agonistas parciales de PPAR-gamma se identifican en este ejemplo por su capacidad de desplazar un agonista de PPAR-gamma conocido de la unión a PPAR-gamma, por ejemplo, Avandia en este caso. Como alternativa, se pueden usar otros agonistas completos conocidos, por ejemplo L165041 300 nM, para identificar agonistas parciales de PPAR-delta utilizando el ensayo de transactivación esencialmente como se describe en el Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 8 Ensayo de desplazamiento de ligando de agonista de PPAR-gamma parcial**

Se realiza un ensayo adicional para identificar agonistas parciales de PPAR-gamma usando el ensayo competitivo POLARSCREEN PPAR de Invitrogen de la siguiente manera para el análisis de la unión al bolsillo de unión al ligando de PPAR-gamma.

1. Se dispensan 20 microlitros compuesto de ensayo 2X en la cubeta
2. Se añaden 20 microlitros de 2X PPAR-LBD/Fluormone Green Complex y se mezcla
3. Se incuba en la oscuridad durante 2 horas
4. Se mide el valor de polarización de fluorescencia
5. Como control, se usa rosiglitazona (Avandia)

Los resultados de DPD respecto a AVANDIA se muestran en la Fig 6.

#### **Ejemplo 9 Ensayos de captación de glucosa**

Este ejemplo ilustra que los compuestos identificados como agonistas de PPAR-gamma también producen un efecto fisiológico en ensayos celulares, esperado de un agonista de PPAR-gamma, a saber, un efecto sobre la captación de glucosa. Los ensayos de captación de glucosa son importantes para establecer la aptitud de un compuesto para el tratamiento de la resistencia a la insulina.

En pocas palabras, se cultivan preadipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos hasta confluencia. Se lavan las células con DMEM libre de suero y se incuban con 1 ml del mismo medio a 37 °C durante 1-2 h. A continuación, las células se lavan con tampón de Krebs-Ringer-Hepes (KRP) y se incuban entonces con 0,9 ml de tampón KRP a 37 °C durante 30 min. Se añade insulina se añadió a las células a concentraciones finales 0, 0,3, 1 y 3 nM y se incuba durante 15 min a 37 °C. La captación de glucosa se inicia mediante la adición de 0,1 ml de tampón fosfato de Krebs-Ringer (KRP) suplementado con [<sup>3</sup>H]-2-desoxi-D-glucosa (1 mCi/l) 10 mM. Después de 10 min de incubación a 37 °C, se aspira el medio y se lavan las placas con PBS enfriado con hielo para terminar la captación de glucosa inducida. Se lisan las células con 0,5 ml de Triton X-100 al 1 % y se determinan los niveles de radiactividad usando un contador de centelleo. Los resultados se representan en la figura 7.

En resumen, e demuestra que DPD y una serie de análogos a los que se hace referencia en la Tabla II son agonistas de PPAR-gamma, mientras que la sustancia 10 parecía ser un antagonista de PPAR-gamma. Las sustancias 7 y 13 son análogos particularmente interesantes ya que estos muestran una mayor potencia, mientras

que causan una baja o nula diferenciación de adipocitos.

Tabla II – Las sales de terc- butilamina de los compuestos SN1, SN4, SN10, SN18 y SN27 están englobadas por la invención. Los compuestos restantes están fuera del alcance de la invención reivindicada.

5

SN	Estructura	PPAR	Adip.
1		P	0
2		P	0
3		-	-
4		P+	0
5		P-	0
6		P	0
7		P+++	0
8		Derivado de Boc inactivo	-1
9		P	0

SN	Estructura	PPAR	Adip.
10		Antagonista	0
11		P+	+1
12		P	-1
13		P+++	-1
14			
15			
16			
17			
18		P	-1
19		P	0

SN	Estructura	PPAR	Adip.
20		P	0
21		P+	0
22			
23		P+	+1
24		P+	-
25		-	-
26			
27		Inactivo	-
28		Inactivo	-
29		P	-

SN	Estructura	PPAR	Adip.
30		P	-
31		P+	0
32		P++	-
33		P	-
34		P	-
35		P	-
36		Inactivo	-
37		Inactivo	0
38		P+	-
39		-	-

#### Ejemplo 10 Actividad del receptor de tromboxano

Este ejemplo demuestra que solamente un enantiómero de la sustancia 1 (SN1) se une al receptor TP.

Cada enantiómero de DPD (SN1 en la Tabla II), concretamente, los compuestos ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 1) y ácido (Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 2, como por elución en columna quiral a continuación), se aisló por cromatografía quiral en las siguientes condiciones:

5 Columna: Chiralpak AD-H 5 µm de 250x4,6 mm

Fase móvil: n-heptano/etanol/ácido trifluoroacético 80/20/0,1

10 Caudal: 1 ml/min

Detección: UV a 230 nm

15 Temperatura: 25 °C

Las muestras se disolvieron en n-heptano/etanol 80/20

El enantiómero 1 eluye primero en la columna quiral y el enantiómero 2 eluye segundo en la columna quiral.

20 Los enantiómeros 1 y 2 se ensayaron en ensayos de unión de radioligandos para la unión al receptor de tromboxano esencialmente como se describe por Hedberg et al. (1988) J. Pharmacol. Exp. Ther. 245: 786-792 y Saussy et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 3025-3029. Mientras que se encontró que el enantiómero ácido ((Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico era un ligante a receptor de tromboxano potente (CI50: 0,841 nM; Ki 0,549 nM), el enantiómero 2 no parecía unirse (CI50 > 10 nM).

### 25 **Ejemplo 11 Inhibición de la proliferación de células cancerosas**

Este ejemplo demuestra el efecto antiproliferativo de DPD sobre el crecimiento de las células cancerosas e ilustra la utilidad de los análogos descritos en este documento para el tratamiento de cáncer.

30 Se usó una línea celular de carcinoma cervicouterino humano (HeLa) diseñada para expresar de forma estable una actividad indicadora biosensora recombinante y una línea de células no cancerosas, HaCaT (Boukamp et al., 1988, J. Cell Biol 106 (3): 761-771), con un kit Caspa Tag (comercialmente disponible, por ejemplo en Chemicon). La detección de la proliferación se llevó a cabo usando un citómetro de flujo automatizado de cribado de alto contenido.

35 Se diluyó el DPD (sustancia 1) a 20 mM en medio de cultivo celular sin suero ajustado a 1 % de DMSO. Se realizó la detección de eventos celulares por duplicado en placas de 96 pocillos después de 48 horas de tratamiento en los canales FL2 (dilución de un marcador de proliferación) de un citómetro de flujo HTS (FACS Calibur HTS, Becton Dickenson). El día 1, las células se sembraron en placas de 96 pocillos. Se trataron las células con DPD y los controles apropiados el día 2 y el análisis se llevó a cabo el día 4.

40 El DPD inhibía un 90 % la proliferación de las células HeLa a 20 microM. El DPD no tenía ningún efecto sobre la línea de células no cancerosas HaCaT, estableciendo así un efecto antiproliferativo selectivo sobre las células cancerosas por DPD (SN1 en la Tabla II).

### 45 **Ejemplo 12**

Este ejemplo ilustra el efecto de reducción de la glucosa de un enantiómero de la invención en un modelo de ratón.

### 50 **Materiales y procedimientos**

#### **Ratones KKA<sup>y</sup>**

55 Se obtuvieron comercialmente (por ejemplo, de Clea Japan) 52 ratones KKAy macho de una edad de 6 semanas y se pusieron a una dieta rica en grasas a su llegada. Los ratones individuales se albergaron en jaulas de IVC de tipo II tanto durante la fase de aclimatación como experimental. Se suministraron tanto la comida (dieta rica en grasas) como el agua a voluntad.

60 1 animal por jaula. 12 h de luz, 12 h de oscuridad. Se encienden las luces a las 06:00 am Temperatura: 21-25 °C. Intervalo diana de humedad relativa: 55-60 %

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de tratamiento según su glucosa en sangre en ayunas de 4 h.

#### 65 **Grupos:**

Vehículo, ácido ((Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (53 mg/kg), rosiglitazona (5 mg/kg; control positivo).

5 **Tratamiento:**

Sonda oral BID cada 12 h durante 14 días.

10 **Finalización:**

4 horas después de la última administración, condiciones de no ayuno.

**Dieta rica en grasas**

15 Se obtuvo una dieta rica en grasas irradiada con gamma en Research Diets, Inc. Nueva Brunswick, NJ (producto nº D12266BI)

**Glucosa en sangre**

20 Se midió la glucosa ya sea en la sangre completa usando la punción con Glucotrend (Roche Diagnostics art. nº 28050) o en el suero (véase más adelante)

**Hematocrito**

25 Se recogió la sangre en capilares de vidrio que contienen heparina que posteriormente se centrifugaron en una centrífuga "HAEMATOKRIT 24" (Hettich) a 15.200xg durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el valor del hematocrito.

30 **Parámetros séricos**

Se determinaron los siguientes parámetros séricos en un analizador automático COBAS INTEGRA 800 (Roche Diagnostics, Suiza) usando los reactivos y protocolos proporcionados por el proveedor.

Glucosa	(Pedido nº 04404483190)
Colesterol	(Pedido nº 03039773190)
Triglicéridos	(Pedido nº 20767107322)
HDL	(Pedido nº 04399803190)
AST	(Pedido nº 20764949322)
ALT	(Pedido nº 20764957322)
ALP	(Pedido nº 03333752190)

35 Se determinó la HbA1c en un analizador automático Hitachi 917 usando el kit de Roche Diagnostics (pedido nº 11822039216) según el protocolo proporcionado por el proveedor.

Se midieron los siguientes parámetros séricos en un formato de placa de microtitulación:

40 Se determinó la insulina usando un kit ELISA (Mercodia, Uppsala, pedido nº 10-1149-01) en una muestra de un microlitro según el protocolo proporcionado por el proveedor.

Se determinó la fructosamina en un formato de 96 pocillos usando el kit de Roche Diagnostics (pedido nº 11930010216) en 5 microlitros de suero según el protocolo proporcionado por el proveedor.

45 Se midieron los ácidos grasos libres AGL usando el kit NEFA C (Wako Chemicals GmbH D-42468 Neuss) según el protocolo del proveedor

50 Todas las medidas se realizaron en el día 14 de la administración, excepto para las medidas de consumo de alimentos y el peso corporal, que se hicieron el día 12.

El día 12, el número de ratones era de 10 (vehículo), 14 (ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, 53 mg/kg) y 10 (rosiglitazona).

55 El día 14, el número de ratones era de 10 (vehículo), 10 (ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-

1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, 53 mg/kg) y 10 (rosiglitazona).

Se midieron los niveles séricos de compuesto en 9 ratones (ácido ((Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico, 53 mg/kg).

5

**RESULTADOS**

Tabla III

Parámetro medido	Valores promedio de los grupos de tratamiento $\pm$ EEM		
	Vehículo	Ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico 53 mg/kg BID	Rosiglitazona 5 mg/kg BID
Glucosa en sangre (mM)	42,5 $\pm$ 1,6	31,9 $\pm$ 3,6*	18,8 $\pm$ 2,2 ***
HbA1C (%)	8,8 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,3*	7,8 $\pm$ 0,4*
Fructosamina (mM)	0,38 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03
Insulina (g/l)	30,9 $\pm$ 3,3	39,1 $\pm$ 8,8	17,9 $\pm$ 4,2*
AGL (mM)	2,2 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1***
TG (mM)	2,2 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,2**
HDL (mM)	2,7 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,2**
Colesterol total (mM)	3,2 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4
Peso corporal (g)	45,9 $\pm$ 1,0	45,4 $\pm$ 1,0	49,5 $\pm$ 1,0*
Ingesta de alimentos (g/día)	5,5 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,6
Peso del corazón (mg)	204,8 $\pm$ 5,3	208,5 $\pm$ 7,6	226,2 $\pm$ 6,9*
Hematocrito (%)	42,1 $\pm$ 1,4	40,1 $\pm$ 1,6	40,3 $\pm$ 1,5
AST (dU/l)	7,1 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 1,0	10,1 $\pm$ 0,9
ALT (dU/l)	5,8 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,6	8,9 $\pm$ 0,9
ALP (dU/l)	30,1 $\pm$ 1,3	21,5 $\pm$ 1,6	26,0 $\pm$ 1,7



Ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico sérico (ng/ml)	NA	161 ± 60	NA
La diferencia estadística (P) de control de vehículo es: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001			

La glucosa circulante es una de las medidas primarias realizadas en la clínica para el diagnóstico de la diabetes, ya que refleja los niveles reales. El objetivo principal de un compuesto reductor de la glucosa es bajar la glucosa circulante.

5 **Conclusión:** Tanto el ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico como el control positivo (rosiglitazona) disminuían (este último ligeramente más) los niveles de glucosa circulante en los ratones hiperglucémicos, indicativo de un efecto reductor de la glucosa del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico.

10 Las fructosaminas, que se forman a partir de proteínas de la sangre glicosiladas, y la HbA1c (hemoglobina glicosilada) reflejan los niveles de glucosa circulante integrados durante un período de tiempo prolongado. Las proteínas de la sangre están glicosiladas irreversiblemente de manera no enzimática. Debido a la vida útil más corta de las proteínas del suero en comparación con los eritrocitos, la fructosamina se considera que es el parámetro de menor intervalo.

15 **Conclusión:** Los niveles de HbA1c disminuyeron por el control positivo (rosiglitazona) y por ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico; los niveles de fructosamina no se vieron afectadas. Se sabe que los agonistas de PPAR-gamma no tienen un inicio inmediato, sino que requieren un cierto tiempo para el inicio, 2-3 semanas en los seres humanos, e incluso más tiempo para alcanzar el efecto máximo. Los niveles de glucosa pueden haber sido de menor magnitud, y no durante un período de tiempo suficiente, para tener un impacto uniforme sobre los niveles de HbA1c y fructosamina.

20 La insulina es una hormona que aumenta la captación de glucosa de la circulación en tejidos como músculo, grasa y tejido adiposo. El ratón KKAy es un modelo de hiperinsulinemia, concretamente, no es deficiente en insulina.

25 **Conclusión:** Sólo el control positivo reducía los niveles de insulina, lo que sugiere que el ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico tiene menor eficacia, como se muestra por el efecto sobre los niveles de glucosa circulante. Los niveles altos de insulina reflejan o bien niveles de glucosa circulante elevados o resistencia a la insulina. Por tanto, parece que mientras que los niveles de glucosa disminuyen, la resistencia a la insulina todavía no ha disminuido; probablemente porque el efecto de la glucosa es reciente, más pequeño, y la resistencia llevará más tiempo.

30 Los niveles elevados de triglicéridos circulantes (TG), colesterol total y ácidos grasos libres (AGL), así como el colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) son factores de riesgo cardiovascular.

35 **Conclusión:** El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico disminuía ligeramente los AGL. El control positivo (rosiglitazona) aumentaba el HDL, disminuía los triglicéridos y AGL.

40 Se midió el peso corporal de los ratones, ya que uno de los efectos secundarios de las tioglitazonas es un peso corporal aumentado en el ratón y ser humano. Además, la disminución de peso corporal es una indicación de efectos secundarios.

45 **Conclusión:** El peso corporal aumentó sólo por el control positivo (rosiglitazona), consistentemente con las observaciones anteriores. El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico no alteró el peso corporal.

El peso del corazón también se midió:

50 **Conclusión:** El peso del corazón aumenta en el grupo de rosiglitazona, probablemente en compensación por el aumento del peso corporal en la terminación. El tratamiento con ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico no tenía efecto sobre el peso del corazón.

55 Un aumento en el hematocrito podría indicar una tendencia a la deshidratación, concretamente, una disminución de la ingesta de agua.

**Conclusión:** No se observó ningún efecto sobre el hematocrito en ninguno de los grupos, lo que sugiere que no hubo deshidratación.

Se miden las enzimas marcadoras de la función hepática comunes aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP) para asegurar que no hay efectos secundarios sobre el hígado.

5 **Conclusión:** No aumentaron las AST, ALT y ALP séricas, lo que sugiere que las dosis usadas estaban desprovistas de efectos adversos.

Se midieron los niveles séricos de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)-4-hexenoico con el fin de documentar que los animales tenían de hecho el compuesto deseado en la circulación.

10 **Ejemplo 13 Ensayo de unión a PPAR-gamma (h) (*E. coli*) recombinante humana:**

Este ejemplo ilustra la unión de un compuesto de la invención a PPAR-gamma humana recombinante.

15 Concentración de ligando: [3H]-rosiglitazona 10 nM

Unión no específica: rosiglitazona (10 µM)

Incubación: 120 min a 4 °C

20 Los resultados se expresan como porcentaje de la unión específica de control ((unión específica / medida/unión específica de control) x 100) obtenida en la presencia de los compuestos de ensayo. Los valores de CI<sub>50</sub> (concentración que produce una inhibición semimáxima de la unión específica de control) y coeficientes de Hill (nH) se determinaron por análisis de regresión no lineal de las curvas competitivas generadas con valores duplicados medios usando el ajuste de curva de la ecuación de Hill ( $Y = D + \frac{[A-D]}{1 + (C/C_{50})^{nH}}$ ), donde y = unión específica, D= unión específica mínima, A= unión específica máxima, C= concentración del compuesto, C<sub>50</sub>= CI<sub>50</sub>, y nH = factor de pendiente). Este análisis se realizó con un software desarrollado en Cerep (software Hill) y validado por comparación con los datos generados por el software comercial SigmaPlot ® 4.0 para Windows ® (© 1997 de SPSS Inc.). Las constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) se calcularon utilizando la ecuación de Cheng Prusoff ( $K_i = C_{50}/(1 + (L/KD))$ ), donde L = concentración de radioligando en el ensayo y KD = afinidad del radioligando por el receptor).

Tabla IV

Compuesto:	Unión a PPAR-gamma	
	CI <sub>50</sub> (µM)	K <sub>i</sub> (µM)
Ácido (Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico	a 30 µM ninguna unión	
Ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico	4,9; 12	1,8; 4,3
Ácido (Z)-6-((2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico	21	
Picotamida	a 10 µM ninguna unión	

35 **Ejemplo 14 Efecto sobre la trombosis arterial en un modelo de ratón**

Este ejemplo ilustra el efecto de un compuesto de la invención sobre la trombosis en un modelo de ratón.

**MATERIALES**

- 40 • Vehículo (DMSO/PEG 400, 5/95)
- Dosis de ácido ((Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico) 1, 3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg en vehículo
- 45 • Solución Salina
- Aspirina (dosis de 100 mg y 600 mg/kg en vehículo)
- Aspirina (Aspégic de Sanofi Synthelabo, disuelta en solución salina)
- 50 • Clopidogrel (Plavix de Sanofi Pharma; disuelto en H<sub>2</sub>O)

Las soluciones se diluyeron 3,3 veces en solución salina y se inyectaron a 100 µl/25 g. Por tanto, las dosis mencionadas anteriormente de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico 100 y 300 mg/kg corresponden a dosis finales de 30 y 100 mg/kg.

- 5 Cabe señalar que el PEG es muy higroscópico y que el DMSO afecta la agregación plaquetaria *ex vivo* a muy baja concentración. Para inyección iv en ratones, este no parece ser un disolvente preferible.

Durante los experimentos, se proporcionó una sal de potasio soluble del fármaco, diluido en solución salina. De esta formulación, se inyectaron 100 µl/25 g iv en la vena de la cola (dosis de 100 mg/kg).

10

### Modelo de trombosis

Se inyectan soluciones (100 µl/25 g de peso corporal) iv en la vena de la cola durante más de 2 minutos para obtener dosis de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico 30 mg/kg y 100 mg/kg. La aspirina se da de la misma manera a una dosis de 200 mg/kg. El clopidogrel se administra por sonda oral a una dosis de 20 mg/kg a las 6-7 horas antes del experimento. Las soluciones fueron codificadas (a excepción de clopidogrel) y el operador desconocía el código. Los animales asignados a cada grupo se agruparon por peso corporal. Todos los ratones usados eran machos de 8-10 semanas de edad y estaban en un fondo genético suizo al 100 %.

15

20

El modelo de trombosis arterial se realizó esencialmente como se describe por Nagai et al. (Nagai N, Lijnen HR, Van Hoef B, Hoylaerts MF, Van Vlijmen BJM. "Nutritionally induced obesity reduces the arterial thrombotic tendency of Factor V Leiden mice". *Thromb Haemost.* octubre de 2007; 98 (4): 858-863 (publicado en línea; doi: 10.1160/TH07-04-0306). En resumen, se deposita un pequeño trozo de papel de seda saturado con una solución de FeCl<sub>3</sub> al 5 % sobre la arteria femoral aislada de los ratones durante 2 min, seguido por un extenso lavado con solución salina (la aplicación comienza aproximadamente 10 min después de la inyección iv). Se monitoriza el flujo sanguíneo en las patas traseras usando un medidor de flujo Doppler por láser de barrido y se recogen las imágenes digitalizadas durante 30 min a intervalos de 15 s (a partir de 1 min después de detener el tratamiento con FeCl<sub>3</sub>). El flujo en cada imagen se expresa como un porcentaje del lado contralateral, y los datos se promedian para todas las 120 imágenes para determinar el flujo total. Se realiza el mismo análisis para intervalos de 10 min (lo que da esencialmente la misma información que el área bajo la curva). Se registra el tiempo de oclusión como la primera imagen que mostró un 0 % de flujo. Se registra el flujo antes del tratamiento como 100 %, y el de las arterias ocluidas como 0 %. Al final del experimento, se recoge sangre en citrato 0,01 M mediante punción cardíaca para la determinación de los recuentos de células sanguíneas. Se prepara el plasma mediante centrifugación y se almacena a -20 °C para la determinación de los niveles de fármaco.

25

30

35

El análisis estadístico de las diferencias entre los dos grupos se realiza mediante la prueba de t de Student no paramétrica. Los tiempos de oclusión > 30 min se consideraron iguales a 30 minutos para el análisis estadístico. Cabe señalar que este enfoque puede dar lugar a un sesgo estadístico, tanto más cuanto que el número de experimentos no es el mismo en los diferentes grupos. La significación se fijó en  $p < 0,05$ .

40

### Resultados

Se usaron un total de 59 ratones en este estudio, de los cuales 4 en los experimentos preliminares para optimizar el esquema de administración. Un ratón (D947) murió durante el experimento (5 min después de la aplicación de FeCl<sub>3</sub> correspondiente a aproximadamente 15 min después de la inyección del fármaco; causa de muerte desconocida) en la dosis de fármaco 100 mg/kg en vehículo.

45

### Tiempos de oclusión

50

- La aspirina a 200 mg/kg no tuvo efecto sobre el tiempo de oclusión; el tiempo de oclusión algo más corto en comparación con el vehículo se debe a dos experimentos con oclusión retardada en el grupo de vehículo (media ± EEM = 7'18" ± 0'33" sin estos)

55

- El clopidogrel evita totalmente la oclusión al cabo de 30 minutos en 6/7 experimentos. En un experimento, se observó una rápida oclusión.

60

- El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico a una dosis de 30 mg/kg en vehículo prolonga ligeramente el tiempo de oclusión en comparación con la aspirina ( $p = 0,024$ ), pero no tiene efecto en comparación con el vehículo.

65

- (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-Clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoato de potasio a una dosis de 100 mg/kg en solución salina prolongaba el tiempo de oclusión ( $p = 0,0006$  frente a la aspirina;  $p = 0,017$  frente a solución salina solamente). Los resultados muestran la inhibición de la formación de la oclusión inducida por FeCl<sub>3</sub> en el modelo de ratón.

**Flujo de sangre**

- 5 • La aspirina a 200 mg/kg no tuvo ningún efecto significativo sobre el flujo de sangre total ( $p= 0,53$  frente al vehículo).
- El clopidogrel mejoraba significativamente el flujo de sangre total ( $p= 0,0087$ , frente al vehículo, incluyendo el experimento B130).
- 10 • El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico a una dosis de 30 mg/kg en vehículo no tuvo efecto sobre el flujo de sangre total ( $p= 0,84$  frente al vehículo y  $p= 0,65$  frente a la aspirina).
- El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico a una dosis de 100 mg/kg en vehículo mejoraba el flujo total de sangre en comparación con la aspirina ( $p= 0,055$ ), pero no en comparación con el vehículo ( $p= 0,45$ ).
- 15 • En todos los grupos, la evolución del flujo sanguíneo con el tiempo era compatible con el tiempo de oclusión observado. En la ventana de tiempo 0 a 10 min, se asoció el ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan- 5-il)hex-4-enoico 100 mg/kg administrado en vehículo con un flujo significativamente mayor en comparación con la aspirina ( $p= 0,0002$ ), pero no en comparación con vehículo solamente ( $p= 0,11$ ). Se observaron las mismas tendencias en puntos temporales posteriores.
- 20 • El (Z)-6 -((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoato de potasio a una dosis de 100 mg/kg en solución salina mejoraba significativamente el flujo de sangre total, en comparación con solución salina ( $p= 0,0032$ ) o aspirina ( $p= 0,0021$ ). Además, en la misma ventana de tiempo, se asociaba significativamente el (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5- il)hex-4-enoato de potasio 100 mg/kg en solución salina con un mayor flujo de sangre en comparación con solución salina sola ( $p= 0,009$ ) o aspirina ( $p= 0,0006$ ). Se observaron las mismas tendencias en puntos temporales posteriores. Con ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico 100 mg/kg en solución salina durante 10-20 min,  $p= 0,0066$  frente a solución salina y  $p= 0,027$  frente a aspirina; durante 20-30 min,  $p= 0,016$  frente a solución salina y  $p= 0,031$  frente a aspirina.
- 25
- 30

35 La Tabla V resume los resultados del análisis de células sanguíneas realizado en una muestra tomada al final del período de observación. Se hace referencia al ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico en la Tabla V como EV.

40 No se observaron cambios importantes en comparación con la aspirina o clopidogrel; Se observaron algunas diferencias moderadas en la distribución de glóbulos blancos.

**Tabla V:** Análisis de células sanguíneas

	Vehículo (n=11)	Solución salina (n=4)	Aspirina (n=7)	Clopidogrel (n=6)	EV 30 mg/kg de vehículo (n = 4)	EV 100 mg/kg de vehículo (n = 9)
Glóbulos blancos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,9 $\pm$ 0,47	1,3 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 0,42	0,62 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,17	1,5 $\pm$ 0,46
Neutrófilos (%)	37 $\pm$ 5,6	42 $\pm$ 14	39 $\pm$ 11	50 $\pm$ 7,2	56 $\pm$ 5,3	34 $\pm$ 12
Linfocitos	62 $\pm$ 5,6	56 $\pm$ 15	60 $\pm$ 11	47 $\pm$ 7,8	42 $\pm$ 4,7	58 $\pm$ 11
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1005 $\pm$ 44	935 $\pm$ 77	1020 $\pm$ 59	1060 $\pm$ 106	1020 $\pm$ 89	895 $\pm$ 46
Glóbulos rojos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8,4 $\pm$ 0,30	9,1 $\pm$ 0,25	9,3 $\pm$ 0,10	9,0 $\pm$ 0,36	9,1 $\pm$ 0,26	9,2 $\pm$ 0,17
Hemoglobina (g/dl)	14 $\pm$ 0,49	15 $\pm$ 0,40	15 $\pm$ 0,19	15 $\pm$ 0,60	15 $\pm$ 0,28	15 $\pm$ 0,30
Hematocrito (%)	66 $\pm$ 2,2	64 $\pm$ 7,8	72 $\pm$ 0,60	72 $\pm$ 2,7	62 $\pm$ 7,3	70 $\pm$ 3,5

Los datos son la media  $\pm$  EEM de n experimentos  
 EV= ácido (Z)-6 -((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4- (2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico

### Ejemplo 15

5 Los ensayos de unión al receptor de tromboxano se realizaron como se describe en el ejemplo 10.

#### Estudios de unión de radioligando a receptor TP:

10 Usando estas condiciones experimentales: células HEK-293 recombinantes humanas, ligando: [<sup>3</sup>H]-SQ-29548 5 nM, vehículo: DMSO al 1 % , tiempo de incubación y temp: 30 min a 25 °C, tampón de incubación: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 154 mM, ligando no específico: SQ-29548 1  $\mu$ M, KD: 9,4 nm; Bmáx: 5,1 pmol/mg de proteína, unión específica: 93 %, se realizó el ensayo según Hedberg A, Hall SE, Ogletree ML, DN Harris y Liu E CK (1988) "Characterization of [5,6-<sup>3</sup>H]SQ 29,548 as a high affinity radioligand, binding to thromboxane A2/prostaglandin H2-receptors in human platelets". J Pharmacol Exp Ther. 245(3): 786-92792 y Saussy DL Jr, Mais DE, Burch RM y Halushka PV (1986) "Identification of a putative thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor in human platelet membranes". J Biol Chem. 261(7): 3025-9.

#### Ensayo de tromboxano sintasa en plaquetas humanas:

20 Usando estas condiciones experimentales: sustrato: PGH<sub>2</sub>10 mM , vehículo: DMSO al 1 % , tiempo y temp. de preincubación: 15 min a 25 °C, tiempo y temp. de incubación: 3 min a 25 °C,

25 tampón de incubación: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, procedimiento de cuantificación: cuantificación por EIA de TxB<sub>2</sub>, se realizó el ensayo según Borsch-Haubold AG, Pasquet S, Watson SP. (1998) "Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059". El SB 203580 también inhibe la tromboxano sintasa. J Biol Chem. 273 (44): 28766-72, y Iizuka K, Akahane K, Momose D, M Nakazawa, Tanouchi T, Kawamura M, Ohyama I, Kajiwara I, Iguchi Y, Okada T, Taniguchi K, Miyamoto T, M. Hayashi (1981) "Highly selective inhibitors of thromboxane synthetase. 1. Imidazole derivatives". J Med Chem. 24(10): 1139-48.

#### Agregación plaquetaria por receptor TP- conejo:

35 Usando estas condiciones experimentales: plasma rico en plaquetas de conejo de Nueva Zelanda (2,75  $\pm$  0,25 kg), vehículo: DMSO al 0,3 %, ensayo: inhibición de la agregación plaquetaria inducida por U-46619 1,5 mM, tiempo y temp. de incubación: 5 min a 37 °C, tampón de incubación: plasma rico en plaquetas tratado con citrato trisódico (0,13 M), volumen de baño: 0,5 ml, momento de la valoración: 5 min, procedimiento de cuantificación: cambio de densidad óptica, se realizó el ensayo según Patscheke, H. y Stregmeier, K. (1984) "Investigations on a selective non-prostanoid thromboxane antagonist, BM13,177, in human platelets". Thrombosis Research 33: 277-288

#### Agregación plaquetaria por receptor TP- ser humano:

40 Usando estas condiciones experimentales: plasma rico en plaquetas humano (60  $\pm$  10 kg), vehículo: DMSO al 0,3 %, ensayo: inhibición de la agregación plaquetaria inducida por U-46619 3 mM, tiempo y temp. de incubación: 5 min a 37 °C, tampón de incubación: plasma rico en plaquetas reciente tratado con citrato trisódico (0,13 M), volumen de baño: 0,5 ml, momento de la valoración: 5 minutos, procedimiento de cuantificación : cambio de densidad, se realizó el ensayo según Patscheke, H., y Stregmeier, K. (1984) "Investigations on a selective non-prostanoid thromboxane antagonist, BM13,177, in human platelets". Thrombosis Research 33: 277-288

#### Cálculo de CI<sub>50</sub>:

50 Se transformaron los datos en semilogarítmicos y se analizaron entonces usando regresión no lineal a una curva de dosis-respuesta de cuatro parámetros  $Y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{-(\log CE_{50} - X) * \text{pendiente de Hill}})$  usando la función de pendiente variable de log (agonista) frente a respuesta del software GraphPad Prism ([http://graphpad.com/help/prism5/prism5help.htm?usingnonlinear\\_regression\\_step\\_by\\_s.htm](http://graphpad.com/help/prism5/prism5help.htm?usingnonlinear_regression_step_by_s.htm)).

Compuesto:	Agregación plaquetaria				Unión de receptor de tromboxano (TP) a células HEK-293 recombinantes humanas			Plaquetas humanas con tromboxano sintasa	
	Ser humano	Conejo	Conejo		Inhibición (%) a 10 $\mu$ M	Cl <sub>50</sub> (nM)	Ki (nM)	Inhibición (%) a 5 $\mu$ M	Cl <sub>50</sub> (nM)
			Inhibición (%) a 10 $\mu$ M	Inhibición (%) a 30 $\mu$ M					
A	13 a 30 $\mu$ M			15 a 0,1 $\mu$ M	94,96	1260	825	25, 28 a 10 $\mu$ M	12100
B	94 a 1 $\mu$ M 97 a 8 $\mu$ M 100 a 16 $\mu$ M	310		100	102	0,84	0,55	43, 61 a 10 $\mu$ M	7020
3			33		98			12	
4					85	1870	1220	52 a 30 $\mu$ M	17500
5					96 a 0,3 $\mu$ M	23,4	15,3	62 a 30 $\mu$ M	20400
Picotamida				36, 21 a 0,1 mM	66	5950	3880	53 a 10 $\mu$ M	10100

Compuesto A: Ácido (Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 2)

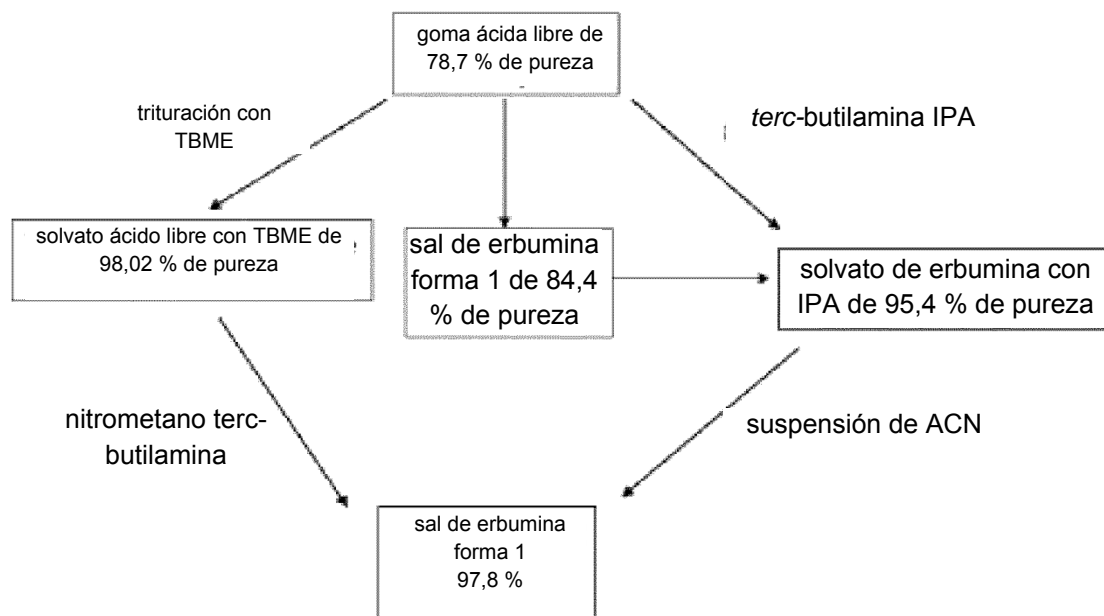
Compuesto B: Ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 1)

Compuesto 3: Ácido (Z)-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-metoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico Compuesto 4: Ácido (Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-metoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico Compuesto 5: Ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-metoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico.

**Ejemplo 16**

5 Preparación de solvatos y sales del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico. El ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (SN1 en la Tabla II) es un aceite de tipo gomoso. El ácido se puede convertir en diversas sales sólidas y solvatos como se ilustra en el esquema a continuación.

10



Se trituró el ácido (14,08 g) se trituró con *terc*-butilmetiléter (TBME, 32 ml, 2,25 vol). Se agitó la solución resultante durante 30 min a temperatura ambiente y durante 30 min en un baño de hielo. El precipitado obtenido de este modo se recogió por filtración, se lavó con TBME enfriado en hielo (2 x 15 ml) y se secó a vacío dando un sólido (8,17 g, 58 %). El sólido obtenido se caracterizó usando un instrumento de RMN Bruker a 400 MHz y se recogieron los patrones de difracción de rayos X en polvo en un difractor Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu Ka (40 kV, 40 mA), y se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) usando un TGA Q500 de TA Instruments. Los datos de RMN y XPRD se muestran en las figuras 11 y 12, respectivamente. El espectro de <sup>1</sup>H-RMN y las señales de TGA son consistentes con los 0,72 moles de TBME presentes. Las señales de TGA y DSC sugieren que hay dos pasos de desolvatación implicados. La primera endotermia de desolvatación tiene inicio a 55 °C y la segunda endotermia de desolvatación se produce a 75 °C. No hay evidencia de una endotermia de fusión. La pureza del compuesto se determinó que era de 98,0 % por HPLC.

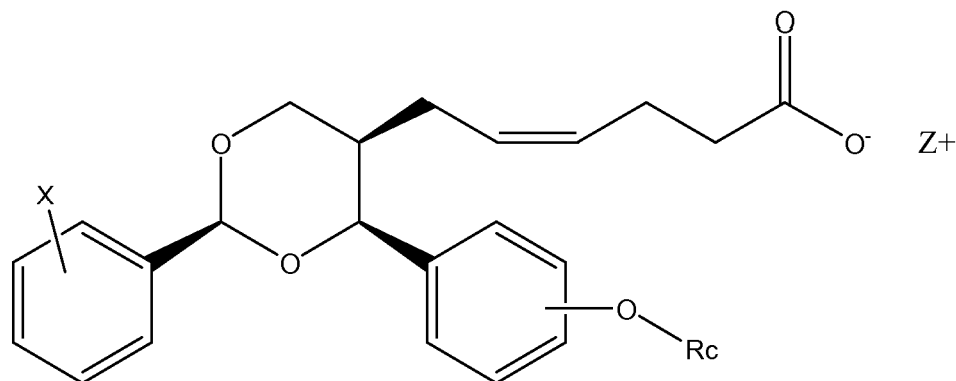
La XRPD de temperatura variable muestra que el material es de la misma forma cristalina hasta una temperatura de 70 °C. A mayor temperatura, el material se convierte en una goma y da un patrón amorfo. Tras enfriamiento a 30 °C, el material permanece como goma con un patrón de XRPD amorfo.

#### **Conversión de solvato de TBME en la sal de erbumina**

Se disolvió el solvato ácido libre de TBME resultante (8,07 g, 20,0 mmol) en nitrometano (16 ml). Se añadió *terc*-butilamina (2,5 ml, 1,2 eq) a temperatura ambiente con agitación constante y se agitó entonces el residuo resultante sobre hielo durante otros 30 min, proporcionando un sólido de tipo gomoso. Se trituró la goma se trituró con acetonitrilo (20 ml) y se recogió por filtración el precipitado resultante. Se puso el sólido a un tamaño de partícula uniforme y se secó a vacío a temperatura ambiente durante 48 horas y después a 40 °C durante 72 horas más, procurando 7,46 g (78,5%) de un material sólido blanco. Se muestran los difractogramas de <sup>1</sup>H-RMN y XPRD en las Figuras 13 y 14, respectivamente. La <sup>1</sup>H-RMN muestra que están presentes 0,17 mol de nitrometano y 1 mol de *terc*-butilamina en el sólido, que se encontró que era puro al 97,8 % por HPLC. La cantidad de nitrometano disminuye aún más por secado. Los datos de TGA muestran una pérdida de peso con inicio a ~ 100 °C consistente con la pérdida de *terc*-butilamina y la DSC muestra endotermia con inicio a 130 °C, también consistente con la pérdida de *terc*-butilamina. En otro procedimiento, se disolvió el ácido (452,23 mg, 1,12 mmol) en IPA (2 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la solución a 50 °C y se añadió *terc*-butilamina. Precipitó un material cristalino después de 1 hora. Se aumentó el volumen de IPA a 23 ml, se volvió a disolver el material con calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente durante 48 horas. Se obtuvo un material blanco cristalino con un rendimiento del 34 %. La caracterización de este material lo identificó como un solvato de IPA con una pureza química del 95,4 %. El difractograma (Figura 15) muestra la formación de la sal de erbumina del compuesto como un solvato de IPA.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto cristalino de fórmula XIV:



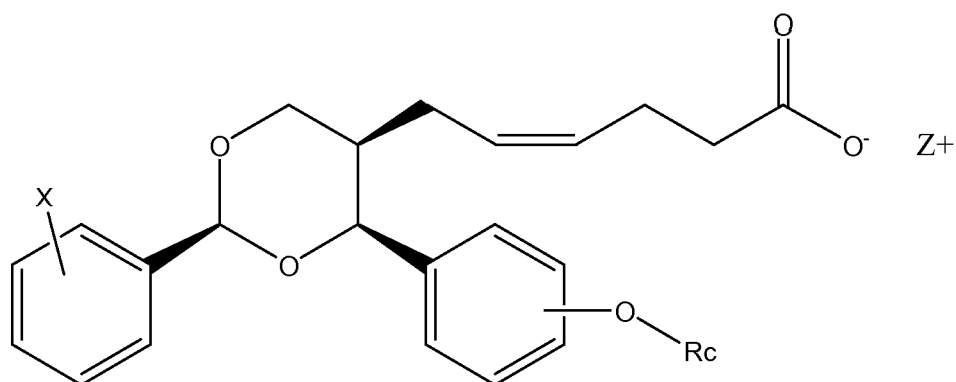
en la que X se selecciona de fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo opcionalmente sustituido, ciano, metoxi y nitro; y

Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -CH(O), un sacárido o-H; Z<sup>+</sup> es Me<sub>3</sub>CNH<sub>3</sub><sup>+</sup>,

para uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones de la diabetes en un paciente que padece resistencia a la insulina y/o diabetes, en el que las complicaciones de la diabetes se seleccionan del grupo que consiste en: complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos; nefropatía diabética o retinopatía diabética; trastornos en la sensibilidad a la insulina después de traumatismo, cirugía o infarto de miocardio; síndrome metabólico, hiperinsulinemia, dislipidemia, tolerancia reducida a la glucosa; riesgo de desarrollar trastornos cardiovasculares y/o diabetes mellitus de tipo II; aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia o dislipidemia; daño a los vasos sanguíneos y los riñones y daño renal.

2. Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 1 en el que la sal no está solvatada, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en  $11 \pm 0,2^\circ$  y  $20,9 \pm 0,2^\circ$  en la escala 2-teta cuando se obtiene de una fuente de radiación de cobre.

3. Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 1, en el que el compuesto es un solvato cristalino que comprende un compuesto de fórmula XIV:



en la que X se selecciona de fluoro, cloro, bromo, trifluorometilo, fenilo opcionalmente sustituido, ciano, metoxi y nitro; y

Rc es alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> (ramificado o lineal), -CH(O), un sacárido o-H; Z<sup>+</sup> es una terc-butilamina; y



un disolvente seleccionado del grupo que consiste en terc-butilmetiléter, alcohol isopropílico, nitrometano y combinaciones de los mismos.

- 5 **4.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 3, en el que el disolvente es alcohol isopropílico y el disolvente comprende menos de un mol de alcohol isopropílico por mol de sal.
- 10 **5.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 1, en el que X es halógeno.
- 6.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según la reivindicación 5, en el que X es cloro.
- 15 **7.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 5, en el que X está en la posición orto.
- 8.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según la reivindicación 1, en el que el alquilo C<sub>1-6</sub> es lineal o el -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub> es lineal.
- 20 **9.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
- ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico;
- 25 ácido (Z)-6-((2S, 4S, 5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-metoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico;
- ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-acetoxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico; y (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoato de metilo.
- 30 **10.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 1, en el que las complicaciones de la diabetes son las complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos.
- 11.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 10, en el que la afección clínica es nefropatía diabética.
- 35 **12.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, formulado como una composición farmacéutica.
- 13.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, formulado como una composición farmacéutica para liberación retardada, modificada, mantenida o controlada del compuesto.
- 40 **14.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 13, en el que la composición comprende al menos un modificador de la tasa de liberación.
- 45 **15.** Un compuesto que comprende una sal cristalina o solvato de la sal de *tert*butilamina del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.
- 50 **16.** El compuesto según la reivindicación 15 que es una forma cristalina de la sal de *tert*-butilamina del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo como se muestra en la Figura 14.
- 17.** El compuesto según la reivindicación 15, que es un solvato de *tert*-butilmetiléter del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico.
- 55 **18.** El compuesto según la reivindicación 15 que es la forma cristalina del solvato de *tert*-butilmetiléter del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo como se muestra en la Figura 12.
- 60 **19.** El compuesto según la reivindicación 15 que es un solvato de alcohol isopropílico de la sal de *tert*-butilamina del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxano -cis-5-il)hex-4-enoico.
- 65 **20.** El compuesto según la reivindicación 15 que es la forma cristalina del solvato de alcohol isopropílico de la sal de *tert*-butilamina del ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo como se muestra en la Figura 15.

- 21.** Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las reivindicaciones 15-20 y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 5 **22.** Compuesto para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 10, en el que la afección clínica es retinopatía diabética.

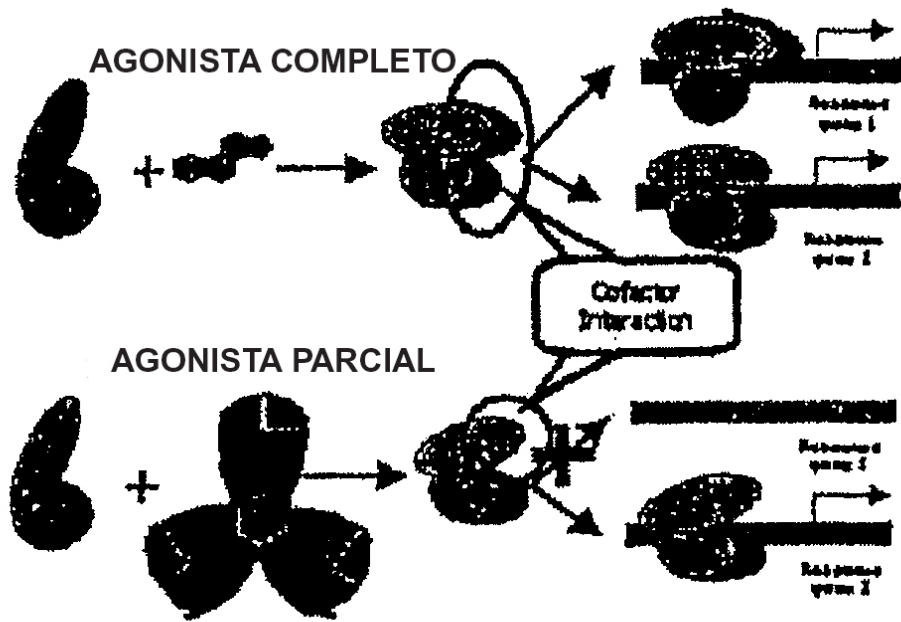


FIG. 1

# transactivación de LBD de PPAR

## Activación dependiente de la dosis de LBD de hPPAR $\gamma$

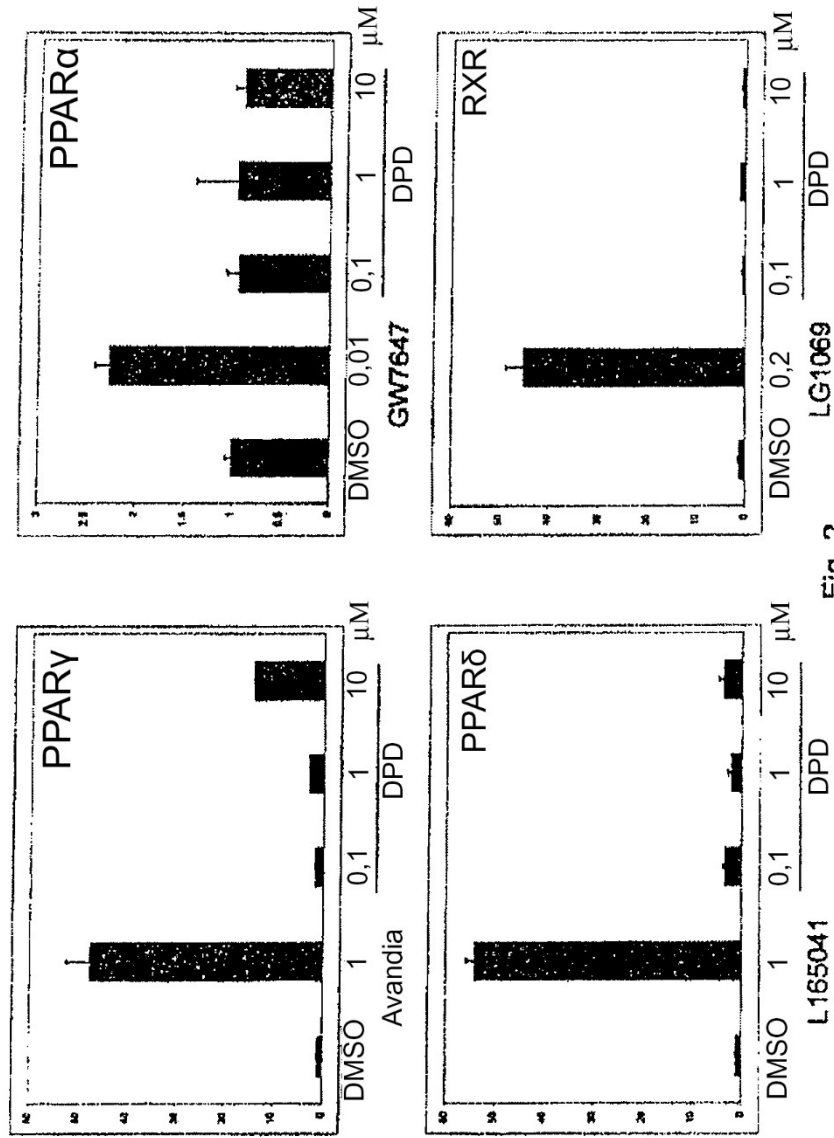


Fig. 2

transactivación de PPAR $\gamma$   
Activación de hPPAR $\gamma$ 2 completo al 64 % del  
control positivo Avandia

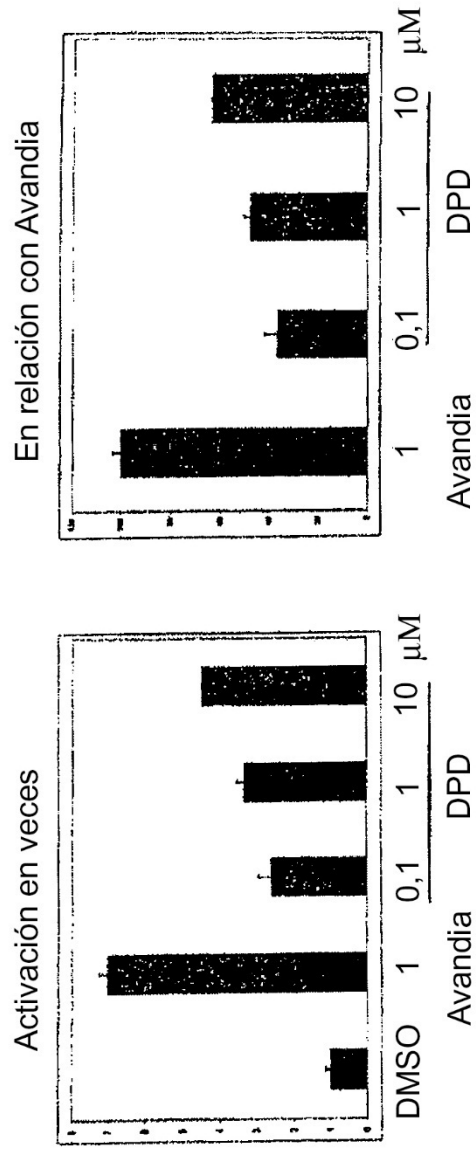


Fig. 3

transactivación de PPAR $\delta$ -FL  
sin Activación de hPPAR $\delta$  completo

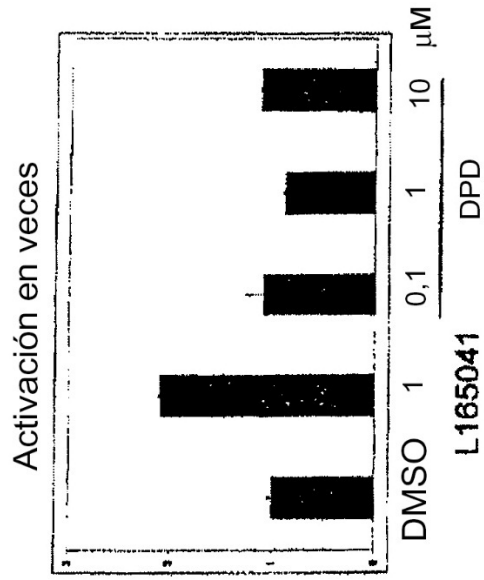


Fig. 4

# Ensayo de agonista parcial de PPAR $\gamma$

Actividad agonista parcial de PPAR $\gamma$  dependiente de la dosis

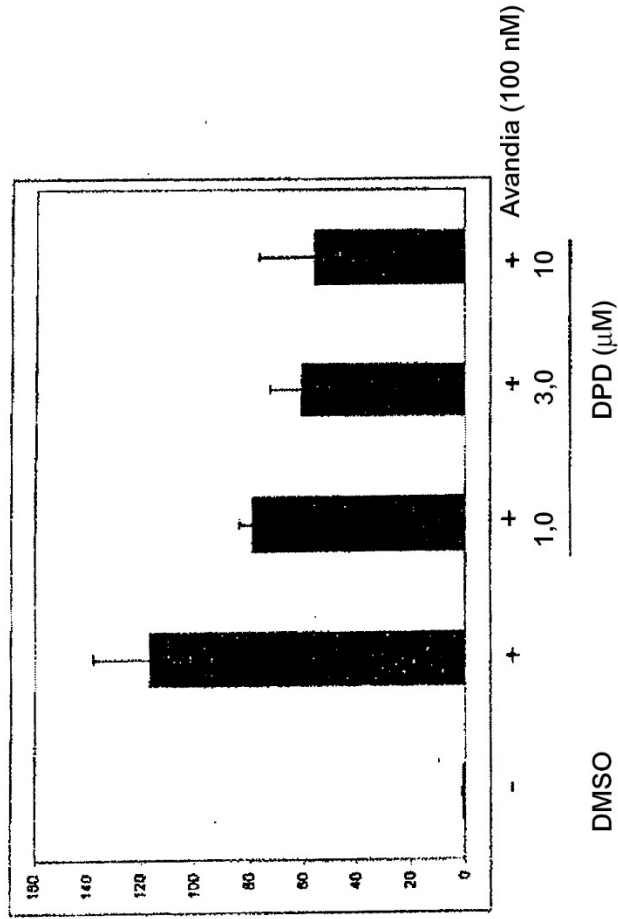


Fig. 5

# desplazamiento de ligando de PPAR $\gamma$ unión a LBD de hPPAR $\gamma$ con una $CI_{50} = 15 \mu M$

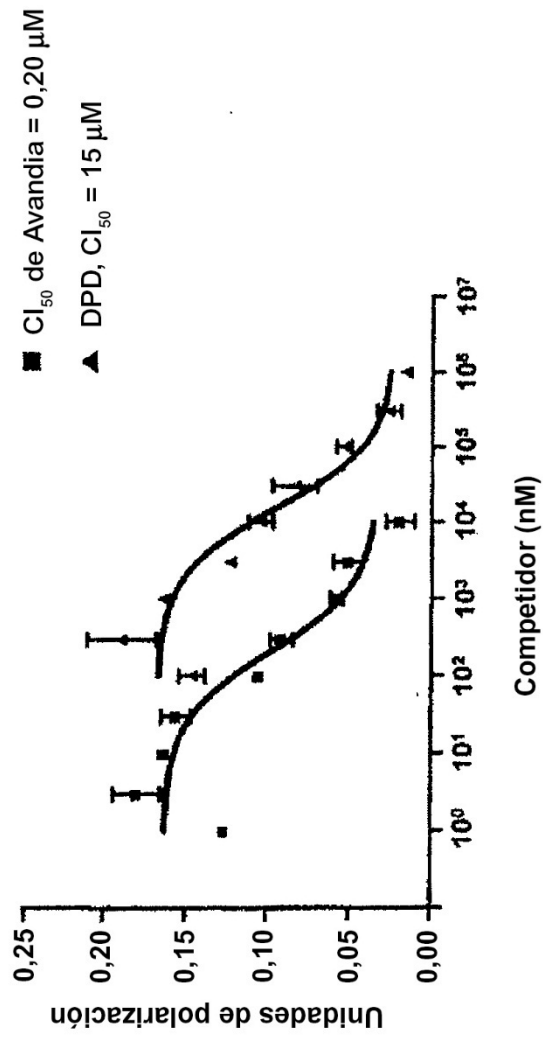


Fig. 6



# Estimulada por insulina

Aumento dependiente de la dosis de la captación de glucosa

Captación de glucosa

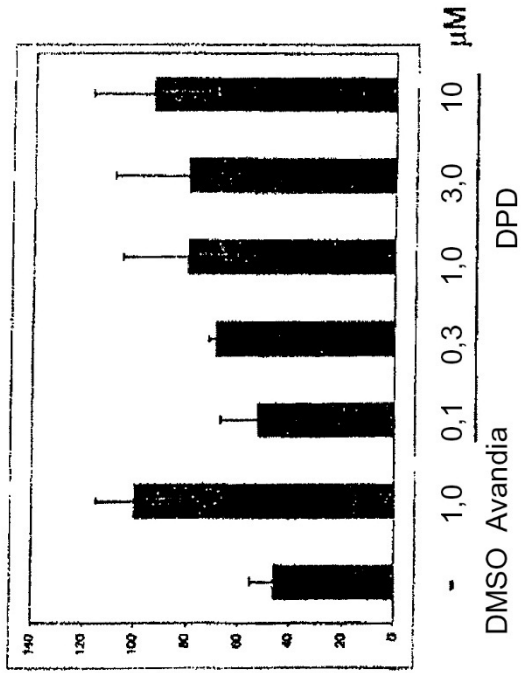


Fig. 7

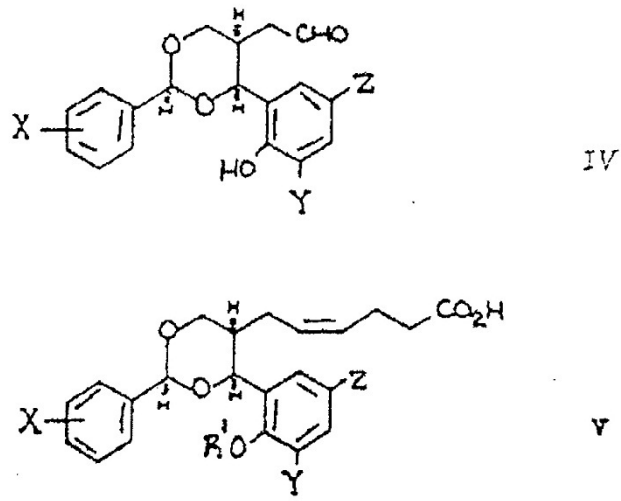
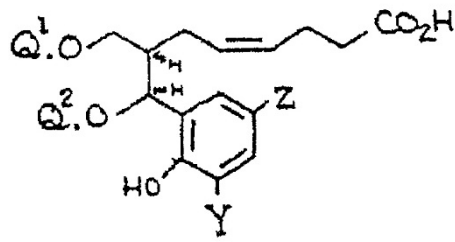
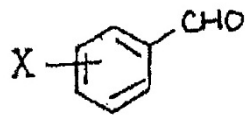


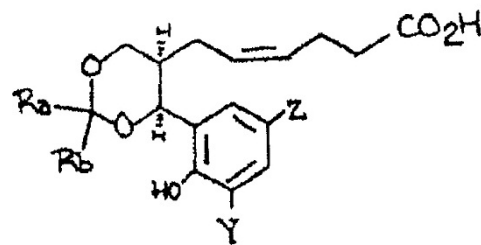
Figura 8



VI



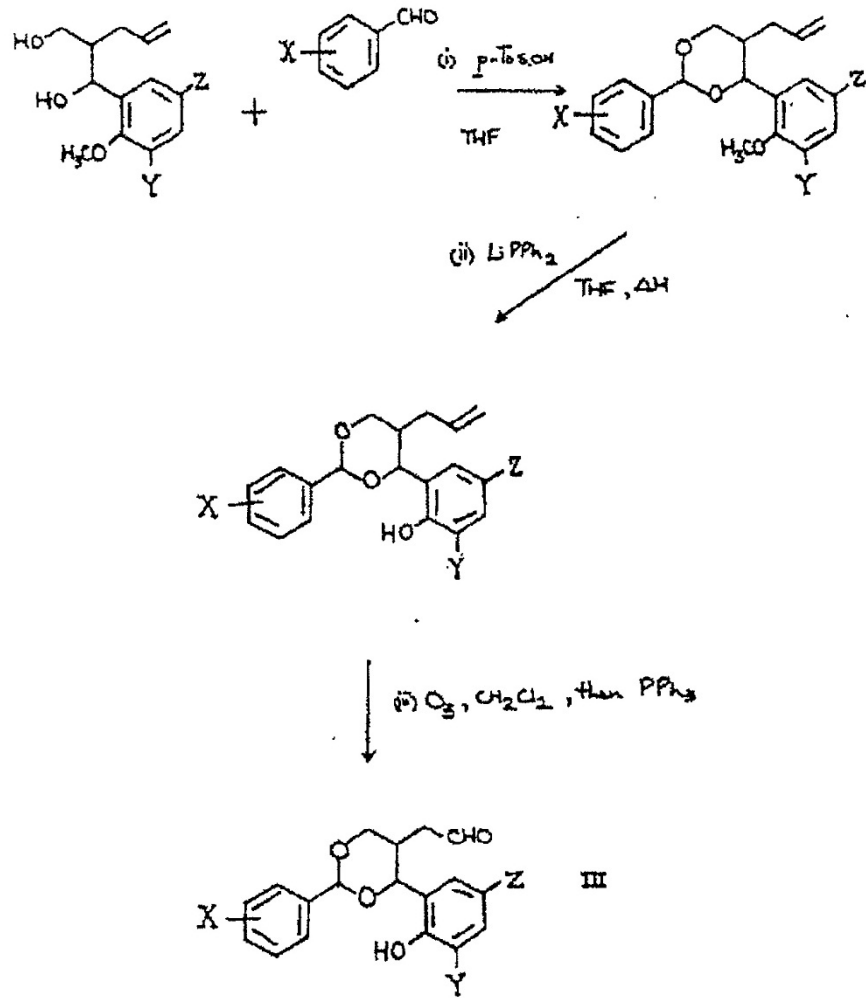
VII



VIII

Figura 9

Esquema 1



Tos=p-toluenosulfonilo

Ph = fenilo

Figura 10

Figura 11

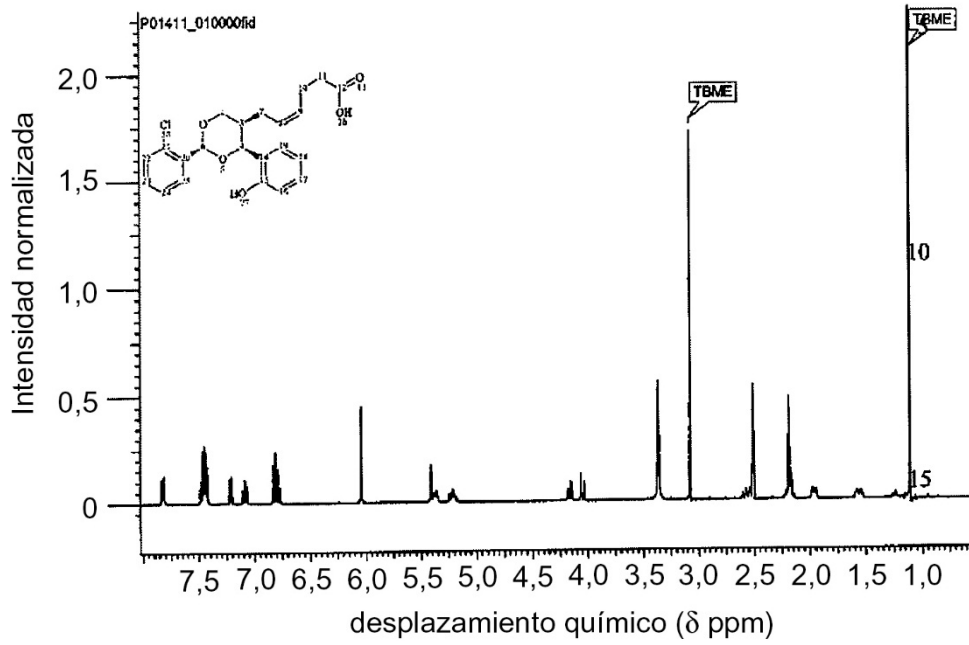


Figura 12

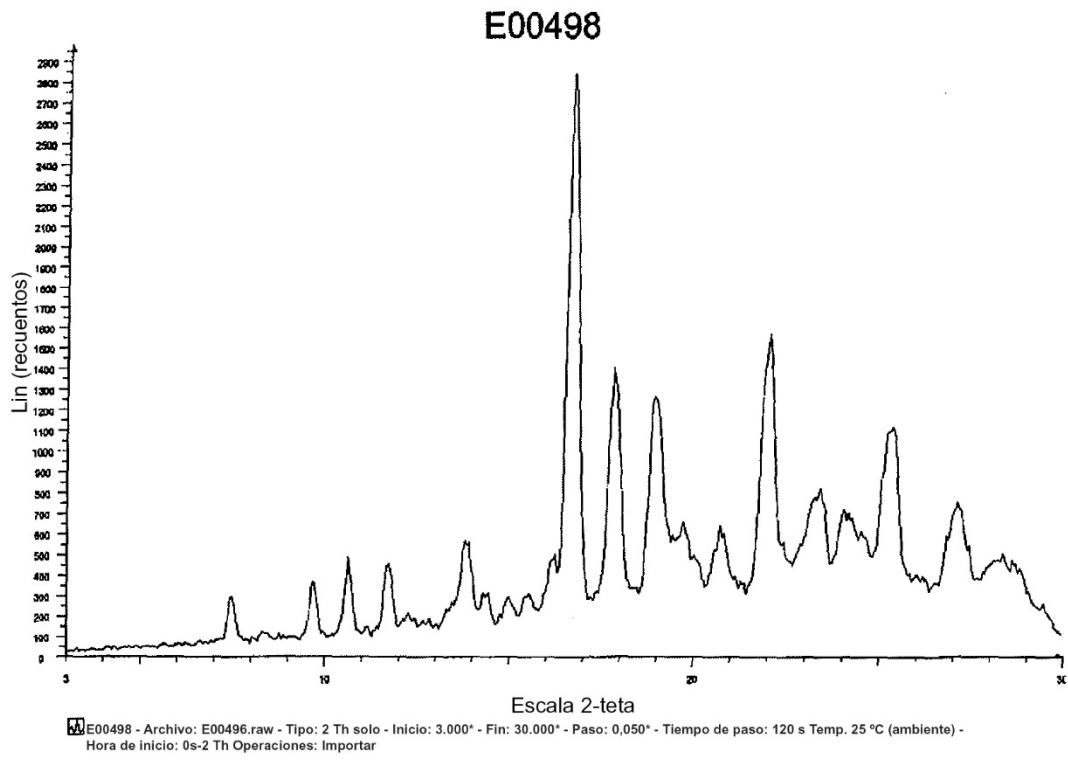


Figura 13

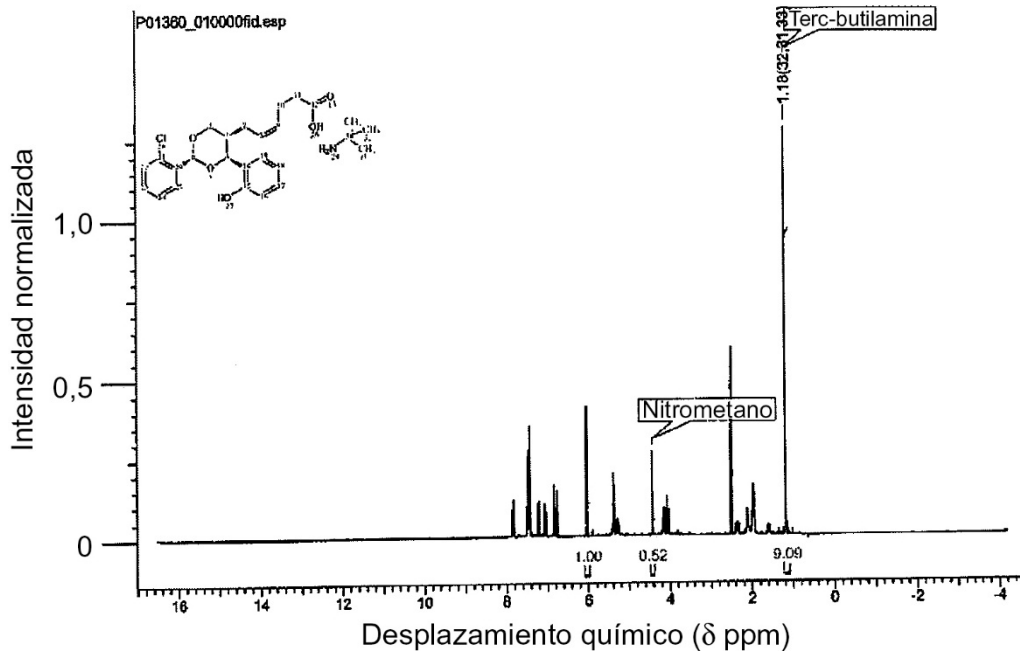


Figura 14

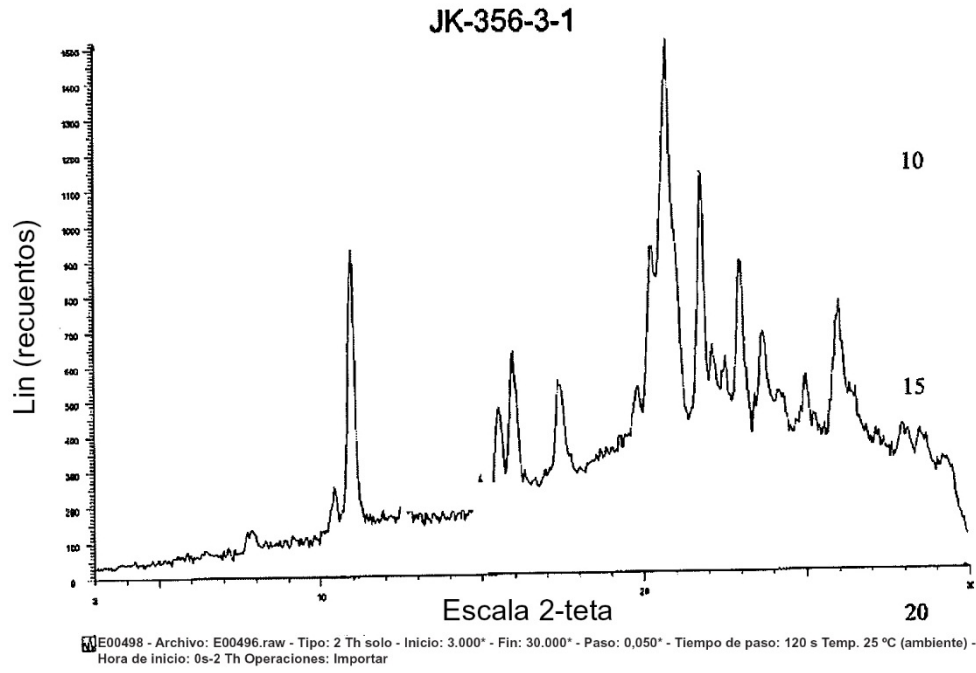
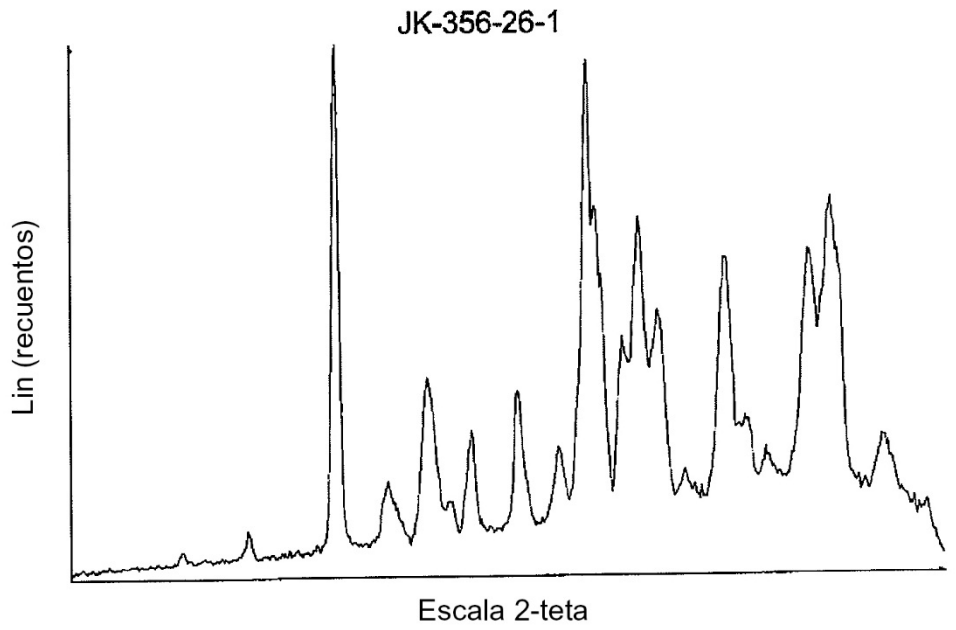




Figura 15



E00498 - Archivo: E00496raw - Tipo: 2 Th solo - Inicio: 3.000° - Fin: 30.000° - Paso: 0,050° - Tiempo de paso: 120 s Temp. 25 °C (ambiente) - Hora de inicio: 0s - 2-Operaciones 2-Th: Importar