

CP

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-023120- -00000-0000

Fecha: 2014-02-04 16:50:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: 3-(BIFENIL-3-IL)-4-HIDROXI-8-METOXI-1-AZAESPIRO[4.5]DEC-3-EN-
2-ONAS SUSTITUIDAS

SOLICITANTE: BAYER INTELLECTUAL PROPERTY

DIRECCIÓN: Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim, Alemania.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 4 de Febrero de 2014

P2014/000019

OLARTI

OLARTE MOURE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-023120-00000-0000

Fecha: 2014-02-04 16:50:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000019

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH**

Dirección: Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim,
Alemania.

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

DIRECCIÓN VER PAGINA ADJUNTA

NACIONALIDAD O DOMICILIO: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2012/064974

Fecha Julio 31, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/017600

Fecha Febrero 07, 2013

6

Título (54) **3-(BIFENIL-3-IL)-4-HIDROXI-8-METOXI-1-AZAESPIRO[4.5]DEC-3-EN-2-ONAS SUSTITUIDAS**

Clasificación Internacional (51) C07D 209/54, A61K 31/403, A61P 35/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

DE

(32) Fecha

Agosto 04, 2011

(31) Número de Solicitud

10 2011 080406.4

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha _____



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



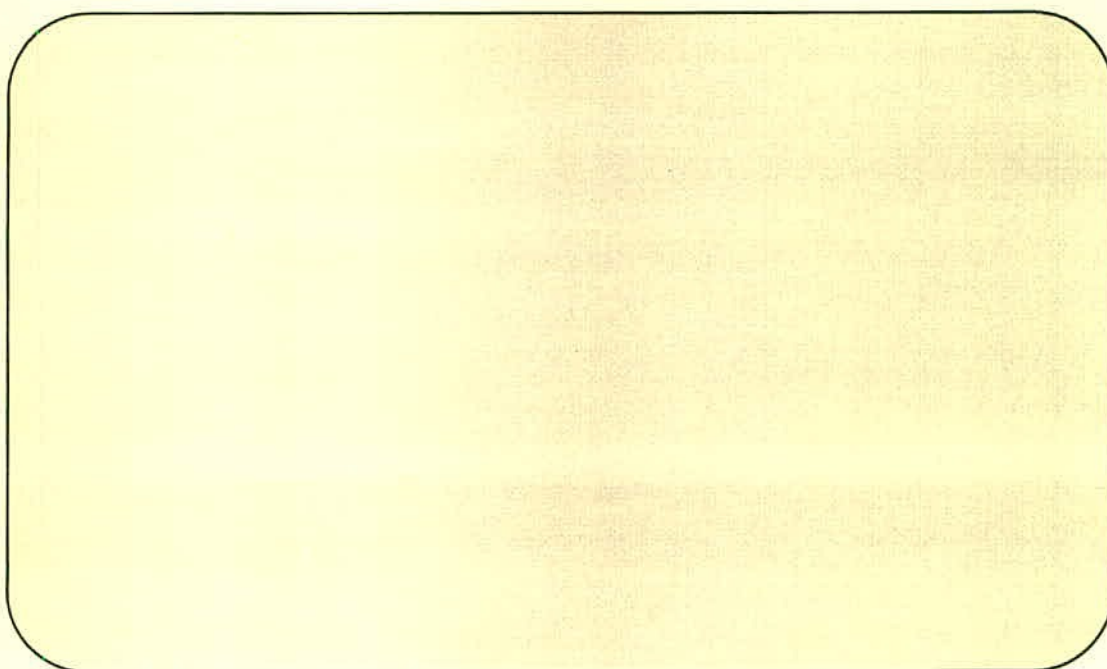
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2012/064974

Ningshu LIU

Ringstr. 89a,
2203 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Kai THEDE

Stargarder Strasse 62,
10437 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Ursula MÖNNING

Eichendamm 5,
15569 Woltersdorf,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Arne SCHOLZ

Schönhauser Allee 170,
10435 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Christoph-Stephan HILGER

Langenauer Weg 24,
13503 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Ulf BÖMER

Leipziger Str. 49,
16548 Glienicke/Nordbahn,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Reiner FISCHER

Nelly-Sachs-Str. 23,
40789 Monheim,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

4

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020	Fecha: 2014/02/04/ AAAA MM DD 2014	Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-23120	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 11 ARCHIVOS:
11 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS
EL CD SE ENCUENTRA UBICADO EN EL FOLIO (4)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0013070

Bogotá D.C., Febrero 04 de 2014 - 16:43:41

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	8105	24/01/2014		386.250.00
RECIBO DE CA	999999999	8113	24/01/2014		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	11530	31/01/2014		1.200.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	619181286	04/02/2014	42.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

1 50005-01-01 SOLICITUDES

CONCEPTO

1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE
INVENCION

Vr.UNDITARIO

515.000.00

Vr.CONCEPTO

515.000.00

\$515.000.00

=====

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-023120- -00000-0000

Fecha: 2014-02-04 16:50:12
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 4 de 2014 - 16:43:42



PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000019

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH**

Dirección: Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim, Alemania.

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

DIRECCIÓN VER PAGINA ADJUNTA

NACIONALIDAD O DOMICILIO: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2012/064974

Fecha Julio 31, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/017600

Fecha Febrero 07, 2013

6

Título (54) 3-(BIFENIL-3-IL)-4-HIDROXI-8-METOXI-1-AZAESPIRO[4.5]DEC-3-EN-2-ONAS SUSTITUIDAS

Clasificación Internacional (51) C07D 209/54, A61K 31/403, A61P 35/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

DE

(32) Fecha

Agosto 04, 2011

(31) Número de Solicitud

10 2011 080 406.4

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha _____

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones. Bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. PCT/IB306.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____
C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2012/064974

Ningshu LIU

Ringstr. 89a,
2203 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Kai THEDE

Stargarder Strasse 62,
10437 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Ursula MÖNNING

Eichendamm 5,
15569 Woltersdorf,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Arne SCHOLZ

Schönhauser Allee 170,
10435 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Christoph-Stephan HILGER

Langenauer Weg 24,
13503 Berlin,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Ulf BÖMER

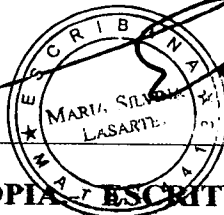
Leipziger Str. 49,
16548 Glienicke/Nordbahn,
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Reiner FISCHER

Nelly-Sachs-Str. 23,
40789 Monheim,
Alemania
Nacionalidad: Alemana



960 24 157



015080567

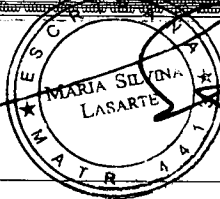
FOLIO 283.- PRIMERA COPIA DE ESCRITURA NÚMERO: SETENTA Y CINCO.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH.------

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día **VEINTICUATRO** de **MAYO** del año **DOS MIL DOCE**, ante mí, María Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial Número 1.788, **COMPARECE: Dagmar MESSERER**, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 20.383.892, con domicilio en la Avenida Del Libertador 5.954, Piso 7º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- **INTERVIENE:** por su propio derecho.- Y la compareciente **EXPRESA: PRIMERO:** Que la Sociedad **"BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH"**, con domicilio en Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789 Monheim, Alemania, le confirió, con fecha 25 de Abril de 2.012, en dicho país, un Poder, el cual mediante escritura número 72, del día de la fecha, otorgada ante mí, al folio 274, protocolo corriente, de este Registro Notarial Número 1788, a mi cargo, fue incorporado y transcrito al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista y en lo pertinente transcribiré en la presente.- **SEGUNDO:** Manifiesta bajo juramento que el referido poder invocado se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- **TERCERO:** En consecuencia, **DICE:** Que en uso de la facultad conferida **SUSTITUYE PARCIALMENTE** el poder mencionado a favor de **Carlos Reinaldo Olarte y/o Juan Guillermo Moure Pérez**, al solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad **"BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH"**,



N 015080567

y actuando en forma individual, indistinta y/o alternadamente, se presenten
exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA, que correspondan y realicen
los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que surgen del mismo, el
que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 274.- PRIMERA COPIA.-
ESCRITURA NÚMERO: SETENTA Y DOS.- ...- En la Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, ..., el día VEINTICUATRO de MAYO del año DOS MIL DOCE, ante
mí ..., COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de
1.968, hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del
Documento Nacional de Identidad Número 20.383.892, con domicilio en la Avenida
Del Libertador 5.954, Piso 7º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es
mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y la compareciente
EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la Autorizante, LA
INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del PODER que fuera
conferido en Leverkusen, Alemania, el día 25 de Abril de 2.012, por la Sociedad
"BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GmbH", con domicilio Alfred-Nobel-
Strasse 10, 40789 Monheim, Alemania, a favor de Gerardo Messerer y/o Dagmar
Messerer y/o Karen Messerer y/o Moeller & CO. S.A., indistintamente, sobre cuya
plena vigencia responde la requirente bajo juramento.- Yo, la Autorizante, hago
constar: a) Que el instrumento de poder cuya incorporación y transcripción a este
protocolo solicita la compareciente, se encuentra extendido en idioma castellano,
certificadas las firmas por notario en idiomas inglés y alemán, debidamente legalizado
en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre
de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la Traductora Pública
Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo manifestado tiene interés
legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega en este acto del



[Handwritten signature]

N° 015080568

1 original del instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al idioma
2 nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "PODER Los abajo firmante/s
3 Bayer Intellectual Property GmbH domiciliados en Alfred-Nobel-Strasse 10 40789
4 Monheim, Alemania declaran por el presente otorgar a Gerardo MESSERER y/o
5 Dagmar MESSERER y/o Karen MESSERER y/o MOELLER & CO. S.A.
6 indistintamente poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades ...,
7 sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes de invención,
8 el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual
9 y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas
10 autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes,
11 formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos,
12 oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias,
13 recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las
14 autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato
15 para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio
16 que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica,
17 Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio,
18 patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que
19 actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier
20 jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los
21 falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que
22 infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u
23 otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las
24 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
25 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán



N 015080568

presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier
autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir
pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver
posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar,
recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar
cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento,
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este
mandato. Podrán asimismo sustituir el presente poder en todo o en parte. ... Dado y
firmado en - Sigue una firma ilegible (Aclarado:) Dr. J. Thomaier, ppa. - Sigue una
firma ilegible (Aclarado:) C. Linder".- ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta
consta: a) La certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma inglés
y alemán, efectuada por el Escribano Público de Leverkusen, Alemania, Klaus
Striewski; y b) La respectiva legalización de la firma y sello del nombrado Notario
(Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961), en idioma
alemán, efectuada por el Vicepresidente del Tribunal Regional de Colonia, Alemania,
Doctor Dumke.- En hoja adjunta sigue la referida traducción al idioma nacional la que
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA (A continuación de un
PODER otorgado en idioma nacional por la Sociedad "Bayer Intellectual Property
GmbH", con sede en Alfred-Nobel-Strasse 10 - 40789 Monheim, Alemania, figuran
los siguientes textos, que traducidos dicen:) ... Acta N° 656/2012 - 1. Certifico que
las personas llamadas: - Dr. Jörg Thomaier, domicilio comercial: D-40789 Monheim,
Alfred-Nobel-Strasse 10, Alemania, - Sra. Claudia Linder, domicilio comercial: 51368
Leverkusen, Chempark, Alemania, comparecieron ante mí y otorgaron el siguiente

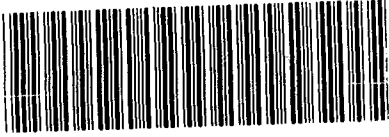
9,



N 015080569

1 documento firmándolo personalmente – todas personas de mi conocimiento –
2 Confirmo que el Dr. Jörg Thomaier y la Sra. Claudia Linder están autorizados como
3 representantes de “Bayer Intellectual Property GmbH”, de Monheim, habiendo tenido
4 a la vista electrónicamente en el día de la fecha el Registro de Comercio del Tribunal
5 Regional de Düsseldorf constatando que los mismos, según el capítulo B 67604 son
6 representantes autorizados.- 2. (Siguen los textos en alemán de su original en inglés) –
7 Leverkusen, 25 de abril de 2012 - (Hay un sello en oblea adherido sobre precinto:
8 Klaus Striewski - Escribano de Leverkusen - Firma (Firmado y aclarado:) Klaus
9 Striewski – Escribano de Leverkusen.- APOSTILLA – (Convención de La Haya del 5
10 octubre de 1961) – País: República Federal de Alemania - Este instrumento público
11 fue firmado por Klaus Striewski en su carácter de Escribano, estando provisto del
12 sello del Escribano Klaus Striewski de Leverkusen.- Certificado en Colonia, el
13 03.05.2012 por el Vicepresidente del Tribunal Regional con el N° 1880/2012 – Sello
14 (Hay un sello:) Presidente del Tribunal Regional de Colonia – 2 - Firma (Firmado y
15 aclarado:) Doctor Dumke.- ... - ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes pertinentes del
16 documento de referencia que en los idiomas alemán e inglés he tenido a la vista y he
17 vertido al idioma nacional, en Buenos Aires, el 21 de mayo de 2012. Hay una firma
18 ilegible. Hay un sello que dice: “Laura Thieberger-Matrícula de Traductores Alemán-
19 Francés-Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III 98- (La Plata)- Inglés-Tomo III: Folio 14
20 (Cap.)- Tomo III Folio 329 (La Plata)- Colegio de Traductores Públicos N° 173”.- ES
21 COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: “Colegio de Traductores
22 Públicos de la Ciudad de Buenos Aires Corresponde a la Legalización N° 29177/12.
23 Sigue una firma ilegible. Mayra Fiorella Pugliese”.- ...- A continuación sigue la
24 legalización de la firma de la nombrada traductora ...- Constancias Notariales:
25 Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma

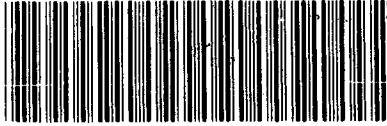
120528 129072



28/05/2012

10 45 21

120528 252762



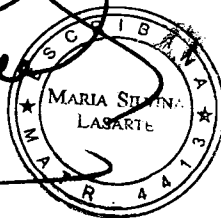
28/05/2012

10 45 21



N 015080569

por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien
así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar
MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello.-"
ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.-
CUARTO: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no
significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; b) Que los nombrados
apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes; y
c) Que el presente instrumento no se encuentra alcanzado por el Impuesto de Sellos,
en virtud de no revestir el carácter de oneroso.- **Constancias Notariales: Identidad**
de la Compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por
conocimiento de la Autorizante.- Informo a la compareciente respecto de los alcances
de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del derecho de leer por sí este
instrumento.- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba
de conformidad la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA
SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. **CONCUERDA** con su escritura
matriz que pasó ante mí, al folio 283 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo.
PARA LA PODERDANTE expido la presente **PRIMERA COPIA** en tres (3) sellos
de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 015080567 al
presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-





L 010811293

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano MARIA SILVINA LASARTE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 120528252762/0. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Lunes 28 de Mayo de 2012

ESC. JUAN MANUEL SANCLEMENTE
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO *de*
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

-

10. Future

Arroyo Viejo

[illegible]

VIII-2-1	Erklärung: Berechtigung, ein Patent zu beantragen und zu erhalten Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regeln 4.17 Ziffer ii und 51bis.1 Absatz a Ziffer ii), für den Fall, daß eine Erklärung nach Regel 4.17 Ziffer iv nicht einschlägig ist: Name (FAMILIENNAME, Vorname)	In bezug auf diese internationale Anmeldung Bayer Intellectual Property GmbH ist kraft des nachfolgend Aufgeführten berechtigt, ein Patent zu beantragen und zu erhalten:
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, LIU, Ningshu
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, THEDE, Kai
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, MÖNNING, Ursula
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, SCHOLZ, Arne
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, HILGER, Christoph-Stephan
VIII-2-1(i)		Bayer Pharma Aktiengesellschaft ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, BÖMER, Ulf
VIII-2-1(i)		Bayer CropSciene AG ist berechtigt, als Arbeitgeber des Erfinders, FISCHER, Reiner
VIII-2-1(ii)		eine Vereinbarung zwischen Bayer CropScience AG und Bayer Pharma Aktiengesellschaft, datiert 01. Januar 2012 (01.01.2012) geändert
VIII-2-1(ii)		eine Vereinbarung zwischen Bayer Pharma Aktiengesellschaft und Bayer Intellectual Property GmbH, datiert 01. April 2012 (01.04.2012) geändert

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
Alfred-Nobel-Str. 10
40789 Monheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2014 (15.01.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BHC113050-WO	
International application No. PCT/EP2012/064974	International filing date (day/month/year) 31 July 2012 (31.07.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address LIU, Ningshu Limonenstr. 28 12203 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address LIU, Ningshu Ringstr. 89a 12203 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
Alfred-Nobel-Str. 10
40789 Monheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2014 (15.01.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BHC113050-WO	
International application No. PCT/EP2012/064974	International filing date (day/month/year) 31 July 2012 (31.07.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address THEDE, Kai Jablonskistr. 26 10405 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address THEDE, Kai Stargarder Strasse 62 10437 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	---

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/QR7CP5F947CRV0

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

7. Februar 2013 (07.02.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2013/017600 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07D 209/54 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/064974

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. Juli 2012 (31.07.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2011 080 406.4

4. August 2011 (04.08.2011)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH** [DE/DE]; Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LIU, Ningshu** [DE/DE]; Limonenstr. 28, 12203 Berlin (DE). **THEDE, Kai** [DE/DE]; Jablonskistr. 26, 10405 Berlin (DE). **MÖNNING, Ursula** [DE/DE]; Eichendamm 5, 15569 Woltersdorf (DE). **SCHOLZ, Arne** [DE/DE]; Schönhauser Allee 170, 10435 Berlin (DE). **HILGER, Christoph-Stephan** [DE/DE]; Langenauer Weg 24, 13503 Berlin (DE). **BÖMER, Ulf** [DE/DE]; Leipziger Str. 49, 16548 Glienicke/Nordbahn (DE). **FISCHER, Reiner** [DE/DE]; Nelly-Sachs-Str. 23, 40789 Monheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**; Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: SUBSTITUTED 3-(BIPHENYL-3-YL)-4-HYDROXY-8-METHOXY-1-AZASPIRO[4.5]DEC-3-EN-2-ONE

(54) Bezeichnung : SUBSTITUIERTE 3-(BIPHENYL-3-YL)-4-HYDROXY-8-METHOXY-1-AZASPIRO[4.5]DEC-3-EN-2-ONE

(57) Abstract: The invention concerns substituted 3-(biphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one, more particularly for therapeutic purposes, pharmaceutical means and the use thereof in treatment, in particular for prophylaxis and for the treatment of tumorous diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft substituierte 3-(Biphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one, insbesondere zu therapeutischen Zwecken, pharmazeutische Mittel und deren Verwendung in der Therapie, insbesondere zur Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen.



WO 2013/017600 A1

Substituierte 3-(Biphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one

Die vorliegende Erfindung betrifft substituierte 3-(Biphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one, insbesondere zu therapeutischen Zwecken, pharmazeutische Mittel
5 enthaltend die erfindungsgemäßen Verbindungen und deren Verwendung in der Therapie, insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

Acetyl-CoA Carboxylasen (ACCs) spielen eine Schlüsselrolle in der zellulären Fettsäure-Homöostase. ACCs sind Biotin-enhaltende Enzyme, die die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu
10 Malonyl-CoA in einer ATPabhängigen Weise katalysieren (Kim, 1997; Harwood, 2005; Tong, 2005). Diese Reaktion, die als zwei halbe Reaktionen abläuft, eine Biotin-Carboxylase (BC) Reaktion und eine Carboxyltransferase (CT) Reaktion, ist der erste einleitende Schritt in der Fettsäurebiosynthese und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Pathway.
Es sind zwei humane ACC-Isoformen bekannt, ACC1 und ACC2, die von zwei unterschiedlichen
15 Genen codiert werden (LuTFI ABU-ELHEIGA et al, 1995, Jane WIDMER, et al. 1996). ACC1 ist in lipogenem Gewebe exprimiert (Leber, Fettgewebe), im Zytosol lokalisiert, und füllt den Malonyl-CoA Pool, der als C2-Einheiten Donor für die *de novo* Synthese von langkettigen Fettsäuren durch FASN und anschließende Kettenverlängerung dient. ACC2 ist vor allem in
oxidativen Geweben exprimiert (Leber, Herz, Skelettmuskel) (Bianchi et al., 1990; Kim, 1997),
20 mit den Mitochondrien assoziiert, und reguliert einen zweiten Pool von Malonyl-CoA. Dieser steuert die Fettsäureoxidation durch die Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferase I, dem Enzym das den Eintritt langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien für die β -Oxidation erleichtert (Milgraum LZ, et al., 1997, Widmer J. et al., 1996). Beide Enzyme zeigen eine sehr große Sequenzhomologie und sind ähnlich reguliert durch eine Kombination von transkriptionellen,
25 translationellen und posttranslationellen Mechanismen. In Menschen als auch in Tieren ist die ACC-Aktivität streng durch eine Reihe von diätätischen, hormonellen und anderen physiologischen Mechanismen kontrolliert wie beispielsweise über eine vorwärts allosterische Aktivierung durch Citrat, eine Feedback-Inhibition durch langkettige Fettsäuren, reversible Phosphorylierung und/oder Inaktivierung bzw. Modulation der Enzymproduktion durch veränderte
30 Genexpression.

ACC1 Knockout-Mäuse sind embryonal letal (Swinnen, et al., 2006, Abu-Elheiga, et al. 2005). ACC2 Knockout-Mäuse zeigen reduzierte Malonyl-CoA-Spiegel in Skelett und Herzmuskel, erhöhte Fettsäureoxidation im Muskel, erniedrigte Leberfettlevel, erniedrigte Mengen an
35 Gesamtkörperfett, erhöhte Level von UCP3 im Skelettmuskel (als Zeichen einer erhöhten Energieaufwendung), ein erniedrigtes Körpergewicht, erniedrigte Spiegel von freien Fettsäuren im Plasma, erniedrigte Plasma-Glucose-Spiegel, erniedrigte Mengen an Glycogen im Gewebe, und sie

sind geschützt vor Nahrungs-induziertem Diabetes und Fettleibigkeit (Abu-Elheiga et al., 2001, 2003; Oh et al., 2005).

Zusätzlich zur Beteiligung an der Fettsäuresynthese in lipogenen Geweben und der

- 5 Fettsäureoxidation in oxidativen Geweben, wurde eine Hochregulation von ACC und gesteigerte Lipogenese in vielen Tumorzellen beobachtet (Swinnen, et al., 2004, Heemers, et al., 2000, Swinnen, et al., 2002, Rossi, et al., 2003, Milgraum, et al., 1997, Yahagi, et al., 2005). Dieser Phenotyp trägt sehr wahrscheinlich zur Entwicklung und Progression von Tumoren bei, die regulatorischen Mechanismen hierfür müssen jedoch noch geklärt werden.

10

EP0454782 und US5759837 schützen die Verwendung von Fettsäuresyntheseinhibitoren zur Inhibierung von Tumorzellwachstum. Zyklische Ketoenole sind nicht offenbart.

15

Es wurde eine Reihe von Substanzen entdeckt, die in der Lage sind, Pflanzen und/oder Insekten-ACC zu inhibieren.

20

Die PCT Patent Applikation PCT/EP99/01787, publiziert als WO 99/48869, die dem europäischen Patent EP 1 066 258 B1 entspricht, bezieht sich auf neue Arylphenyl-substituierte zyklische Ketoenole, zu einer Mehrheit der Prozesse für ihre Herstellung und ihre Nutzung als Pestizide und Herbizide.

25

Von 3-Acyl-pyrrolidin-2,4-dionen sind pharmazeutische Eigenschaften vorbeschrieben (S. Suzuki et al. Chem. Pharm. Bull. 15 1120 (1967)). Weiterhin wurden N-Phenylpyrrolidin-2,4-dione von R. Schmierer und H. Mildenberger (Liebigs Ann. Chem. 1985, 1095) synthetisiert. Eine biologische Wirksamkeit dieser Verbindungen wurde nicht beschrieben.

30

In EP-A-0 262 399 und GB-A-2 266 888 werden ähnlich strukturierte Verbindungen (3-Aryl-pyrrolidin-2,4-dione) offenbart, von denen jedoch keine herbizide, insektizide oder akarizide Wirkung bekannt geworden ist. Bekannt mit herbizider, insektizider oder akarizider Wirkung sind unsubstituierte, bicyclische 3-Aryl-pyrrolidin-2,4-dion-Derivate (EP-A-355 599, EP-A-415 211 und JP-A-12-053 670) sowie substituierte monocyclische 3-Aryl-pyrrolidin-2,4-dion-Derivate (EP-A-377 893 und EP-A-442 077).

35

Weiterhin bekannt sind polycyclische 3-Arylpyrrolidin-2,4-dion-Derivate (EP-A-442 073) sowie 1H-Arylpyrrolidin-dion-Derivate (EP-A-456 063, EP-A-521 334, EP-A-596 298, EP-A-613 884, EP-A-613 885, WO 95/01 971, WO 95/26 954, WO 95/20 572, EP-A-0 668 267, WO 96/25 395, WO 96/35 664, WO 97/01 535, WO 97/02 243, WO 97/36 868, WO 97/43275, WO 98/05638, WO 98/06721, WO 98/25928, WO 99/24437, WO 99/43649, WO 99/48869, WO 99/55673, WO 01/17972, WO 01/23354, WO 01/74770, WO 03/013249, WO 03/062244, WO 2004/007448,

- WO 2004/024 688, WO 04/065366, WO 04/080962, WO 04/111042, WO 05/044791,
WO 05/044796, WO 05/048710, WO 05/049569, WO 05/066125, WO 05/092897,
WO 06/000355, WO 06/029799, WO 06/056281, WO 06/056282, WO 06/089633,
WO 07/048545, DEA 102 00505 9892, WO 07/073856, WO 07/096058, WO 07/121868,
5 WO 07/140881, WO 08/067873, WO 08/067910, WO 08/067911, WO 08/138551,
WO 09/015801, WO 09/039975, WO 09/049851, WO 09/115262, WO10/052161, WO 10/063378,
WO 10/063670, WO10/063380, WO10/066780, WO10/102758, WO2010/135914,
WO2011/067131, WO2011/067135, WO2011/067203 und WO2011/067240.
- 10 Außerdem sind ketalsubstituierte 1-H-Arylpyrrolidin-2,4-dione aus WO 99/16748 und (spiro)-
ketalsubstituierte N-Alkoxy-alkoxy-substituierte Aryl-pyrrolidindione aus JP-A-14 205 984 und Ito
M. et al. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67, 1230-1238, (2003) bekannt. Außerdem
sind aus WO 06/024411 herbizide Mittel enthaltend Ketoenole bekannt.
- 15 4'-Biphenyl-substituierte Tetronsäurederivate werden in WO 2008/022725 für die Therapie viraler
Erkrankungen offenbart.
- WO 2005/089118 und WO2007/039286 offenbaren generisch stickstoffhaltige bitykliche
Strukturen für die Therapie, wobei 5'-Biphenyl-substituierte zyklische Ketoenole nicht spezifisch
20 genannt sind.
- Den strukturell nächstliegenden Stand der Technik könnten Verbindungen darstellen, die anstelle
einer Trifluormethylgruppe oder einer Methoxymethylgruppe in Position 8 des Azaspiro[4.5]dec-
3-en-2-on-Ringsystems eine Methylgruppe besitzen. Derartige Verbindungen gehören teilweise
25 zum Stand der Technik und sind zum Beispiel in der WO10/063378 offenbart.
- Den strukturell nächstliegenden Stand der Technik könnten auch Verbindungen darstellen, die
anstelle einer Methoxygruppe in Position 8 des Azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on-Ringsystems ein
Wasserstoffatom besitzen. Derartige Verbindungen gehören teilweise zum Stand der Technik und
30 sind zum Beispiel in der WO 07/048545 (Beispiel I-1-a-5) offenbart.
- Die WO10/063378 und die WO 07/048545 betreffen dabei Erfindungen auf einem anderen
Sachgebiet, nämlich auf dem Gebiet der Herbizide.
- 35 Die nahe gelegenen Strukturen des Standes der Technik sind ausnahmslos auf dem Gebiet der
Herbizide, Insektizide oder Fungizide bekannt. Für diese Strukturen ist es zum einen nicht bekannt,
zum anderen nicht vorhersehbar, ob sie humanes ACC inhibieren. Umso mehr ist es für diese

Strukturen unbekannt und unvorhersehbar, ob sie eine Selektivität gegen eine der humanen ACC-Isoformen besitzen.

5 Ausgehend von diesem Stand der Technik, ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Strukturen für die Therapie von menschlichen und tierischen Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.

Insbesondere sollen die erfindungsgemäßen Strukturen zur Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen geeignet sein und Vorteile gegenüber im Stand der Technik bekannten Strukturen aufweisen.

10

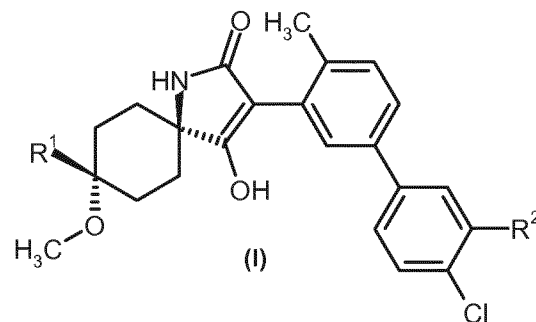
Dabei sollen vor allem Strukturen für die Therapie von Erkrankungen zur Verfügung gestellt werden, die humanes ACC1 stark inhibieren. Die gesuchten Strukturen sollen dabei humanes ACC1 stärker inhibieren als humanes ACC2, d.h. eine Selektivität gegen humanes ACC2 besitzen.

15 Vorzugsweise sollen Strukturen für die Therapie von Erkrankungen zur Verfügung gestellt werden, die zusätzlich auch eine, besser mehrere oder am besten sogar alle der folgenden Eigenschaften besitzen:

- 20 - sie inhibieren humanes ACC1 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen mit einem IC₅₀ von weniger als 300 nM, besser von weniger als 200 nM, noch besser von weniger als 100 nM im beschriebenen Assay,
- sie inhibieren humanes ACC2 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen mit einem IC₅₀ von mehr als 0,5 µM, besser von mehr als 1,5 µM, noch besser von mehr als 2 µM im beschriebenen Assay,
- 25 - das Verhältnis des IC₅₀ für die Inhibition von humanem ACC2 zum IC₅₀ für die Inhibition von humanem ACC1 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen beträgt mindestens einen Faktor 8, besser mindestens einen Faktor 15, noch besser mindestens einen Faktor 20,
- sie inhibieren die Tumorzellproliferation von MCF7-Zelllinien nach Einfachmessung oder
30 besser im Mittelwert aus mehreren Messungen mit einem IC₅₀ von weniger als 250 nM, besser weniger als 100 nM, noch besser weniger als 50 nM im beschriebenen Assay,
- sie besitzen einen logP/D-Wert von kleiner 3, besser kleiner 2,5 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen im beschriebenen Assay,

- sie besitzen einen logMA-Wert von kleiner 3, besser kleiner 2.5, noch besser kleiner 2 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen im beschriebenen Assay,
- 5 - sie besitzen eine Proteinbindungskonstante an HSA von größer 1 $\mu\text{mol/l}$ nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen im beschriebenen Assay,
- sie haben bezüglich der Bindung an humanes Plasmaprotein eine freie Fraktion von mehr als 0.1%, besser von mehr als 0.2% nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen im beschriebenen Assay,
- 10 - sie haben ein Verhältnis der freien Fraktionen bezüglich der Bindung an Mäuseplasmaprotein und humanes Plasmaprotein von einem Faktor von weniger als 15, besser weniger als 10 nach Einfachmessung oder besser im Mittelwert aus mehreren Messungen,
- sie haben ein Verhältnis der freien Fraktionen bezüglich der Bindung an das Plasmaprotein verschiedener Spezies, welches zu einer akzeptablen, abgeschätzten Humandosis führt,
- 15 - sie haben pharmakokinetische Parameter, welche zu einer akzeptablen, abgeschätzten Humandosis führen und die Verabreichung als Medikament erlauben.
- sie haben eine niedrige Clearance.
- sie haben eine hohe Bioverfügbarkeit,
- 20 - sie haben ein moderates bis hohes Verteilungsvolumen,
- sie haben eine akzeptable relative Bioverfügbarkeit, welche zu einer akzeptablen, abgeschätzten Humandosis führt und die Verabreichung als Medikament erlaubt,
- sie haben eine abgeschätzte humane Halbwertszeit von nicht mehr als zwei Wochen,
- sie haben eine in vivo Wirkung im PC3-Xenograft-Maus-Modell,
- 25 - sie haben eine Wirkung im PC3-Xenograft-Maus-Modell mit Plasmaspiegeln, die zu einer akzeptablen, abgeschätzten Humandosis führen,
- die für sie nach dem beschriebenen Verfahren abgeschätzte menschliche Tagesdosis liegt unter 2 g, besser unter 1 g pro Patient.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass Verbindungen der Formel (I)



wobei

5 R^1 für eine Trifluormethyl- oder Methoxymethylgruppe und

R^2 für Wasserstoff oder Fluor steht

sowie deren Salze

besonders gut für die Therapie von Erkrankungen geeignet sind und die erfindungsgemäße Aufgabe lösen.

10

Dabei war nicht vorhersehbar, ob und welches der als Insektizide oder Herbizide bekannten Strukturen die erfindungsgemäße Aufgabe löst, nämlich eine Struktur darstellt, die bei der Therapie von menschlichen und/oder tierischen Erkrankungen eingesetzt werden kann.

15 Umso weniger war es vorhersehbar, ob und welches der als Insektizide oder Herbizide bekannten Strukturen humanes ACC inhibiert, geschweige denn ob und welches eine Selektivität gegen eine der humanen Isoformen aufweist.

Aus der großen Gruppe der als Insektizide, Fungizide oder Herbizide bekannten zyklischen
 20 Ketoenole haben sich die Verbindungen der Formel (I) überraschenderweise durch eine gute Enzyminhibition des humanen ACC1 hervorgehoben. Dabei weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine erhöhte Selektivität gegen humanes ACC2 auf und inhibieren vor allem ACC1. Diese Eigenschaft war nicht vorhersehbar und qualifiziert die erfindungsgemäßen Verbindungen für eine Therapie mit verringerten Nebenwirkungen. Unerwünschte Nebenwirkungen haben
 25 wahrscheinlich ihre Ursache in der gleichzeitigen Inhibition des humanen ACC2's, während die Wirkungen vor allem auf der Inhibition des humanen ACC1's beruhen.

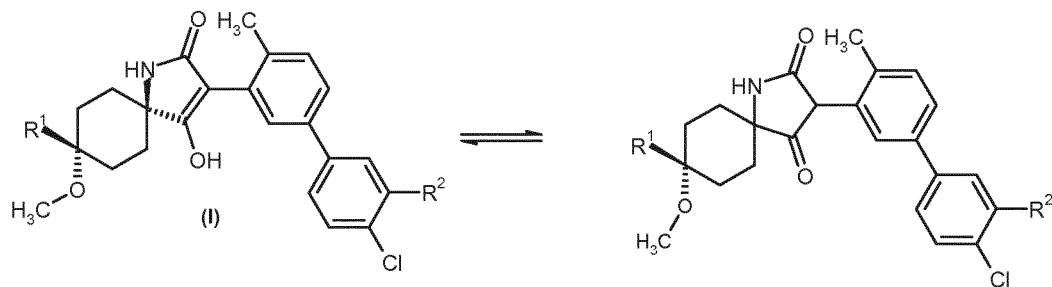
Die Selektivität gegen humanes ACC2 scheint dabei strukturell auf der trans-Methoxy-Gruppe in Position 8 des Azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on-Ringsystems der erfindungsgemäßen Strukturen zu
 30 beruhen. Sofern diese trans-Methoxy-Gruppe schon in verwandten Strukturen des Standes der Technik verwirklicht ist, war zum Zeitpunkt der Erfindung unbekannt, ob und mit welcher

Selektivität diese Strukturen humane ACC's inhibieren.

Ebenfalls als von der vorliegenden Erfindung als erfasst anzusehen ist die Verwendung der physiologisch verträglichen Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen.

5

Ebenfalls als von der vorliegenden Erfindung als erfasst anzusehen ist die Verwendung der tautomeren Formen der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I), z.B.



10

Physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen auch Salze üblicher Basen, wie beispielhaft und vorzugsweise Alkalimetallsalze (z.B. Natrium- und Kaliumsalze), Erdalkalisalze (z.B. Calcium- und Magnesiumsalze) und Ammoniumsalze, abgeleitet von Ammoniak oder organischen Aminen mit 1 bis 16 C-Atomen, wie beispielhaft und vorzugsweise Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Ethyldiisopropylamin, Monoethanolamin, Diethanolamin, Triethanolamin, Dicyclo-hexylamin, Dimethylaminoethanol, Prokain, Dibenzylamin, N-Methylmorpholin, Arginin, Lysin, Ethylendiamin und N-Methylpiperidin.

15

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel enthaltend die erfindungsgemäßen Verbindungen und mindestens einen oder mehrere weitere Wirkstoffe,

20

insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck kann sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie z.B. oral, parenteral, pulmonal, nasal, sublingual, lingual, buccal, rectal, dermal, transdermal, conjunctival, otisch oder als Implantat bzw. Stent.

25

Für diese Applikationswege können die erfindungsgemäßen Verbindungen in geeigneten Applikationsformen verabreicht werden.

30

Für die orale Applikation eignen sich nach dem Stand der Technik funktionierende schnell und/oder modifiziert die erfindungsgemäßen Verbindungen abgebende Applikationsformen, die die erfindungsgemäßen Verbindungen in kristalliner und/ oder amorphisierter und/oder gelöster

Form enthalten, wie z.B. Tabletten (nichtüberzogene oder überzogene Tabletten, beispielsweise mit magensaftresistenten oder sich verzögert auflösenden oder unlöslichen Überzügen, die die Freisetzung der erfindungsgemäßen Verbindung kontrollieren), in der Mundhöhle schnell zerfallende Tabletten oder Filme/Oblaten, Filme/Lyophilisate, Kapseln (beispielsweise Hart- oder Weichgelatinekapseln), Dragees, Granulate, Pellets, Pulver, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole oder Lösungen.

Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. intramuskulär, subcutan, intracutan, percutan oder intraperitoneal). Für die parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Lyophilisaten oder sterilen Pulvern.

Für die sonstigen Applikationswege eignen sich z.B. Inhalationsarzneiformen (u.a. Pulverinhalatoren, Nebulizer), Nasentropfen, -lösungen, -sprays; lingual, sublingual oder buccal zu applizierende Tabletten, Filme/Oblaten oder Kapseln, Suppositorien, Ohren- oder Augenpräparationen, Vaginalkapseln, wässrige Suspensionen (Lotionen, Schüttelmixturen), lipophile Suspensionen, Salben, Cremes, transdermale therapeutische Systeme (wie beispielsweise Pflaster), Milch, Pasten, Schäume, Streupuder, Implantate oder Stents.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch Mischen mit inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen geschehen. Zu diesen Hilfsstoffen zählen u.a. Trägerstoffe (beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Laktose, Mannitol), Lösungsmittel (z.B. flüssige Polyethylenglycole), Emulgatoren und Dispergier- oder Netzmittel (beispielsweise Natriumdodecylsulfat, Polyoxysorbitanoleat), Bindemittel (beispielsweise Polyvinylpyrrolidon), synthetische und natürliche Polymere (beispielsweise Albumin), Stabilisatoren (z.B. Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure), Farbstoffe (z.B. anorganische Pigmente wie beispielsweise Eisenoxide) und Geschmacks- und / oder Geruchskorrigentien.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die die erfindungsgemäßen Verbindungen, üblicherweise zusammen mit einem oder mehreren inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen enthalten, sowie deren Verwendung zu den zuvor genannten Zwecken.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Verbindungen zu pharmazeutischen Präparaten erfolgt

in an sich bekannter Weise, indem man den oder die Wirkstoffe mit den in der Galenik gebräuchlichen Hilfsstoffen in die gewünschte Applikationsform überführt.

- Als Hilfsstoffe können dabei beispielsweise Trägersubstanzen, Füllstoffe, Sprengmittel, Bindemittel, Feuchthaltemittel, Gleitmittel, Ab- und Adsorptionsmittel, Verdünnungsmittel, Lösungsmittel, Cosolventien, Emulgatoren, Lösungsvermittler, Geschmackskorrigentien, Färbemittel, Konservierungs-, Stabilisierungs-, Netzmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks oder Puffer zum Einsatz kommen.
- 5 Dabei ist auf Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed. Mack Publishing Company, East
10 Pennsylvania (1980) hinzuweisen.

- Die pharmazeutischen Formulierungen können in fester Form, zum Beispiel als Tabletten, Dragees, Pillen, Suppositorien, Kapseln, transdermale Systeme oder
- 15 in halbfester Form, zum Beispiel als Salben, Cremes, Gele, Suppositorien, Emulsionen oder in flüssiger Form, zum Beispiel als Lösungen, Tinkturen, Suspensionen oder Emulsionen vorliegen.

- Hilfsstoffe im Sinne der Erfindung können beispielsweise Salze, Saccharide (Mono-, Di-, Tri-,
20 Oligo-, und/oder Polysaccharide), Proteine, Aminosäuren, Peptide, Fette, Wachse, Öle, Kohlenwasserstoffe sowie deren Derivate sein, wobei die Hilfsstoffe natürlichen Ursprungs sein können oder synthetisch bzw. partial synthetisch gewonnen werden können.

- Für die orale oder perorale Applikation kommen insbesondere Tabletten, Dragees, Kapseln,
25 Pillen, Pulver, Granulate, Pastillen, Suspensionen, Emulsionen oder Lösungen in Frage.
Für die parenterale Applikation kommen insbesondere Suspensionen, Emulsionen und vor allem Lösungen in Frage.

- Die vorliegende Erfindung betrifft die erfindungsgemäßen Verbindungen.
- 30 Sie können für die Prophylaxe und Therapie von menschlichen Erkrankungen eingesetzt werden, insbesondere von Tumorerkrankungen.

- Die erfindungsgemäßen Verbindungen können insbesondere verwendet werden, um die Zellproliferation und/oder die Zellteilung zu inhibieren oder zu reduzieren und/oder Apoptosis zu
35 induzieren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von hyper-proliferativen Erkrankungen wie beispielsweise

- Psoriasis,
- Keloide und andere Hyperplasien, die die Haut betreffen,
- 5 - gutartige Prostathyperplasien (BPH),
- solide Tumore und
- hämatologische Tumore.

Als solide Tumore sind erfindungsgemäß beispielsweise Tumore behandelbar der Brust, des
10 Respirationstraktes, des Gehirns, der Fortpflanzungsorgane, des Magen-Darmtraktes, des Urogenitaltraktes, des Auges, der Leber, der Haut, des Kopfes und des Halses, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Knochen sowie des Bindegewebes und Metastasen dieser Tumore.

Als hämatologische Tumore sind beispielsweise behandelbar

- 15 - multiple Myelome,
- Lymphome oder
- Leukämien.

Als Brusttumore sind beispielsweise behandelbar:

- 20 - Mammakarzinome mit positivem Hormonrezeptorstatus
- Mammakarzinome mit negativem Hormonrezeptorstatus
- Her-2 positive Mammakarzinome
- Hormonrezeptor- und Her-2 negative Mammakarzinome
- BRCA –assoziierte Mammakarzinome
- 25 - entzündliches Mammakarzinom.

Als Tumore des Respirationstraktes sind beispielsweise behandelbar

- nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und
- kleinzellige Bronchialkarzinome.

30

Als Tumore des Gehirns sind beispielsweise behandelbar

- Gliome,
- Glioblastome,
- Astrozytome,
- 35 - Meningiome und
- Medulloblastome.

Als Tumore der männlichen Fortpflanzungsorgane sind beispielsweise behandelbar:

- Prostatakarzinome,
- Maligne Hodentumore und
- Peniskarzinome.

5

Als Tumore der weiblichen Fortpflanzungsorgane sind beispielsweise behandelbar:

- Endometriumkarzinome
- Zervixkarzinome
- Ovarialkarzinome
- 10 - Vaginalkarzinome
- Vulvarkarzinome

Als Tumore des Magen-Darm-Traktes sind beispielsweise behandelbar:

- Kolorektale Karzinome
- 15 - Analkarzinome
- Magenkarzinome
- Pankreaskarzinome
- Ösophagukarzinome
- Gallenblasenkarzinome
- 20 - Dünndarmkarzinome
- Speicheldrüsenkarzinome
- Neuroendokrine Tumore
- Gastrointestinale Stromatumore

25 Als Tumore des Urogenital-Traktes sind beispielsweise behandelbar:

- Harnblasenkarzinome
- Nierenzellkarzinome
- Karzinome des Nierenbeckens und der ableitenden Harnwege

30 Als Tumore des Auges sind beispielsweise behandelbar:

- Retinoblastome
- Intraokulare Melanome

Als Tumore der Leber sind beispielsweise behandelbar:

- 35 - Hepatozelluläre Karzinome
- Cholangiozelluläre Karzinome

Als Tumore der Haut sind beispielsweise behandelbar:

- Maligne Melanome
- Basaliome
- Spinaliome
- 5 - Kaposi-Sarkome
- Merkelzellkarzinome

Als Tumore des Kopfes und Halses sind beispielsweise behandelbar:

- Larynxkarzinome
- 10 - Karzinome des Pharynx und der Mundhöhle

Als Sarkome sind beispielsweise behandelbar:

- Weichteilsarkome
- Osteosarkome
- 15

Als Lymphome sind beispielsweise behandelbar:

- Non-Hodgkin-Lymphome
- Hodgkin-Lymphome
- Kutane Lymphome
- 20 - Lymphome des zentralen Nervensystems
- AIDS-assoziierte Lymphome

Als Leukämien sind beispielsweise behandelbar:

- Akute myeloische Leukämien
- 25 - Chronische myeloische Leukämien
- Akute lymphatische Leukämien
- Chronische lymphatische Leukämien
- Haarzellleukämien

- 30 Vorteilhaft können die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden zur Prophylaxe und/oder Therapie von:

Mammakarzinomen, insbesondere von Hormonrezeptor-negativen, Hormonrezeptor-positiven oder BRCA-assoziierten Mammakarzinomen, sowie

Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hepatozellulären Karzinomen, Malignen Melanomen

- 35 und anderen Hauttumoren, Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinom, Kolorektalen Karzinomen und Prostatakarzinomen.

Besonders vorteilhaft können die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, insbesondere Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, insbesondere Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

5

Diese Erkrankungen sind gut charakterisiert im Menschen, existieren aber auch bei anderen Säugetieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I), insbesondere die Verbindungen:

10

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

15

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hepatozellulären Karzinomen, Malignen Melanomen und anderen Hauttumoren, Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen oder Prostatakarzinomen.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, insbesondere Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, insbesondere Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

35

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hepatozellulären Karzinomen, Malignen Melanomen und anderen Hauttumoren, Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen oder Prostatakarzinomen.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, insbesondere Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, insbesondere Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen
15 oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der Verbindung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

- 20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hepatozellulären Karzinomen, Malignen Melanomen und anderen Hauttumoren, Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen oder Prostatakarzinomen.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, insbesondere Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, insbesondere Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen
30 Bronchialkarzinomen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind pharmazeutische Formulierungen in Form von Tabletten enthaltend eine der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen,
35 Hepatozellulären Karzinomen, Malignen Melanomen und anderen Hauttumoren, Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen oder Prostatakarzinomen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind pharmazeutische Formulierungen in Form von Tabletten enthaltend eine der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, insbesondere Hormonrezeptor-positiven
5 Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, insbesondere Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung von Erkrankungen, die mit proliferativen Prozessen einhergehen.
10

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können allein oder bei Bedarf in Kombination mit einer oder mehreren anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, solange diese Kombination nicht zu unerwünschten und inakzeptablen Nebenwirkungen führt. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Arzneimittel, enthaltend eine erfindungsgemäße
15 Verbindung und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie der zuvor genannten Erkrankungen.

Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Verbindungen mit bekannten anti-hyperproliferativen, zytostatischen oder zytotoxischen Substanzen zur Behandlung von Krebserkrankungen kombiniert werden. Die Kombination der erfindungsgemäßen Verbindungen mit anderen für
20 die Krebstherapie gebräuchlichen Substanzen oder auch mit der Strahlentherapie ist besonders angezeigt.

Als geeignete Kombinationswirkstoffe seien beispielhaft genannt:

Afinitor, Aldesleukin, Alendronsäure, Alfaferon, Alitretinoin, Allopurinol, Aloprim, Aloxi, Altretamin, Aminoglutethimid, Amifostin, Amrubicin, Amsacrin, Anastrozol, Anzmet, Aranesp,
25 Argabin, Arsentrioxid, Aromasin, 5-Azacytidin, Azathioprin, BCG oder tice-BCG, Bestatin, Betamethason-Acetat, Betamethason-Natriumphosphat, Bexaroten, Bleomycin-Sulfat, Broxuridin, Bortezomib, Busulfan, Calcitonin, Campath, Capecitabin, Carboplatin, Casodex, Cefeson, Celmoleukin, Cerubidin, Chlorambucil, Cisplatin, Cladribin, Clodronsäure, Cyclophosphamid, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, DaunoXome, Decadron, Decadron-Phosphat, Delestrogen,
30 Denileukin Diftitox, Depomedrol, Deslorelin, Dexrazoxan, Diethylstilbestrol, Diflucan, Docetaxel, Doxifluridin, Doxorubicin, Dronabinol, DW-166HC, Eligard, Elitek, Ellence, Emend, Epirubicin, Epoetin-alfa, Epogen, Eptaplatin, Ergamisol, Estrace, Estradiol, Estramustin-Natriumphosphat, Ethinylestradiol, Ethyol, Etidronsäure, Etopophos, Etoposid, Fadrozol, Farston, Filgrastim, Finasterid, Fligrastim, Floxuridin, Fluconazol, Fludarabin, 5-Fluordeoxyuridin-Monophosphat, 5-
35 Fluoruracil (5-FU), Fluoxymesteron, Flutamid, Formestan, Fosteabin, Fotemustin, Fulvestrant,

- Gammagard, Gemcitabin, Gemtuzumab, Gleevec, Gliadel, Goserelin, Granisetron-Hydrochlorid, Histrelin, Hycantin, Hydrocorton, erythro-Hydroxynonyladenin, Hydroxyharnstoff, Ibritumomab Tiuxetan, Idarubicin, Ifosfamid, Interferon-alpha, Interferon-alpha-2, Interferon-alpha-2 α , Interferon-alpha-2 β , Interferon-alpha-n1, Interferon-alpha-n3, Interferon-beta, Interferon-gamma-1 α , Interleukin-2, Intron A, Iressa, Irinotecan, Kytril, Lapatinib, Lentinan-Sulfat, Letrozol, Leucovorin, Leuprolid, Leuprolid-Acetat, Levamisol, Levofolinsäure-Calciumsalz, Levothroid, Levoxyl, Lomustin, Lonidamin, Marinol, Mechlorethamin, Mecobalamin, Medroxyprogesteron-Acetat, Megestrol-Acetat, Melphalan, Menest, 6-Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Metvix, Miltefosin, Minocyclin, Mitomycin C, Mitotan, Mitoxantron, Modrenal, Myocet, Nedaplatin, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilutamid, Nolvadex, NSC-631570, OCT-43, Octreotid, Ondansetron-Hydrochlorid, Orapred, Oxaliplatin, Paclitaxel, Pediapred, Pegaspargase, Pegasys, Pentostatin, Picibanil, Pilocarpin-Hydrochlorid, Pirarubicin, Plicamycin, Porfimer-Natrium, Prednimustin, Prednisolon, Prednison, Premarin, Procarbazin, Procrit, Raltitrexed, RDEA119, Rebif, Rhenium-186-Etidronat, Rituximab, Roferon-A, Romurtid, Salagen, Sandostatin, Sargramostim, Semustin, Sizofiran, Sobuzoxan, Solu-Medrol, Streptozocin, Strontium-89-chlorid, Synthroid, Tamoxifen, Tamsulosin, Tasonermin, Tastolacton, Taxoter, Teceleukin, Temozolomid, Teniposid, Testosteron-Propionat, Testred, Thioguanin, Thiotepa, Thyrotropin, Tiludronsäure, Topotecan, Toremifen, Tositumomab, Tastuzumab, Teosulfan, Tretinoin, Trexall, Trimethylmelamin, Trimetrexat, Triptorelin-Acetat, Triptorelin-Pamoat, UFT, Uridin, Valrubicin, Vesnarinon, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinorelbin, Virulizin, Zinecard, Zinostatin-Stimalamer, Zofran; ABI-007, Acolbifen, Actimmun, Affinitak, Aminopterin, Arzoxifen, Asoprisnil, Atamestan, Atrasentan, BAY 43-9006 (Sorafenib), Avastin, CCI-779, CDC-501, Celebrex, Cetuximab, Crisnatol, Cyproteron-Acetat, Decitabin, DN-101, Doxorubicin-MTC, dSLIM, Dutasterid, Edotecarin, Eflornithin, Exatecan, Fenretinid, Histamin-Dihydrochlorid, Histrelin-Hydrogel-Implant, Holmium-166-DOTMP, Ibandronsäure, Interferon-gamma, Intron-PEG, Ixabepilon, Keyhole Limpet-Hemocyanin, L-651582, Lanreotid, Lasofoxifen, Libra, Lona-farnib, Miproxifen, Minodronat, MS-209, liposomales MTP-PE, MX-6, Nafarelin, Nemorubicin, Neovastat, Nolatrexed, Oblimersen, Onko-TCS, Osidem, Paclitaxel-Polyglutamat, Pamidronat-Dinatrium, PN-401, QS-21, Quazepam, R-1549, Raloxifen, Ranpirnas, 13-*cis*-Retinsäure, Satraplatin, Seocalcitol, T-138067, Tarceva, Taxoprexin, Thymosin-alpha-1, Tiazofurin, Tipifarnib, Tirapazamin, TLK-286, Toremifen, TransMID-107R, Valspodar, Vapreotid, Vatalanib, Verteporfin, Vinflunin, Z-100, Zoledronsäure, sowie Kombinationen hiervon.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Verbindungen mit anti-hyperproliferativen Agentien kombiniert werden, welche beispielhaft – ohne dass diese Aufzählung abschließend wäre – sein können:

Aminoglutethimid, L-Asparaginase, Azathioprin, 5-Azacytidin, Bleomycin, Busulfan, Carboplatin, Carmustin, Chlorambucil, Cisplatin, Colaspase, Cyclophosphamid, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, Daunorubicin, Diethylstilbestrol, 2',2'-Difluordeoxycytidin, Docetaxel, Doxorubicin (Adriamycin), Epirubicin, Epothilon und seine Derivate, erythro-Hydroxynonyladenin, 5 Ethinyloestradiol, Etoposid, Fludarabin-Phosphat, 5-Fluordeoxyuridin, 5-Fluordeoxyuridin-Monophosphat, 5-Fluoruracil, Fluoxymesteron, Flutamid, Hexamethylmelamin, Hydroxyharnstoff, Hydroxyprogesteron-Caproat, Idarubicin, Ifosfamid, Interferon, Irinotecan, Leucovorin, Lomustin, Mechlorethamin, Medroxyprogesteron-Acetat, Megestrol-Acetat, Melphalan, 6-Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Mitomycin C, Mitotan, Mitoxantron, Paclitaxel, Pentostatin, *N*-Phosphonoacetyl-L-aspartat (PALA), Plicamycin, Prednisolon, Prednison, Procarbazin, Raloxifen, Semustin, 10 Streptozocin, Tamoxifen, Teniposid, Testosteron-Propionat, Thioguanin, Thiotepa, Topotecan, Trimethylmelamin, Uridin, Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin.

In viel versprechender Weise lassen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen auch mit biologischen Therapeutika wie Antikörpern (z.B. Avastin, Rituxan, Erbitux, Herceptin) und rekombinan- 15 ten Proteinen kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit anderen, gegen die Angiogenese gerichteten Therapien positive Effekte erzielen, wie zum Beispiel mit Avastin, Axitinib, Regorafenib, Recentin, Sorafenib oder Sunitinib. Kombinationen mit Inhibitoren des Proteasoms und von mTOR sowie Antihormone und steroidale metabolische Enzyminhibitoren 20 sind wegen ihres günstigen Nebenwirkungsprofils besonders geeignet.

Generell können mit der Kombination der erfindungsgemäßen Verbindungen mit anderen, zytostatisch oder zytotoxisch wirksamen Agentien folgende Ziele verfolgt werden:

- eine verbesserte Wirksamkeit bei der Verlangsamung des Wachstums eines Tumors, bei der Reduktion seiner Größe oder sogar bei seiner völligen Eliminierung im Vergleich zu einer Be- 25 handlung mit einem einzelnen Wirkstoff;
- die Möglichkeit, die verwendeten Chemotherapeutika in geringerer Dosierung als bei der Monotherapie einzusetzen;
- die Möglichkeit einer verträglicheren Therapie mit weniger Nebeneffekten im Vergleich zur Einzelgabe;
- 30 • die Möglichkeit zur Behandlung eines breiteren Spektrums von Tumorerkrankungen;
- das Erreichen einer höheren Ansprechrate auf die Therapie;
- eine längere Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zur heutigen Standardtherapie.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in Verbindung mit einer 35 Strahlentherapie und/oder einer chirurgischen Intervention eingesetzt werden.

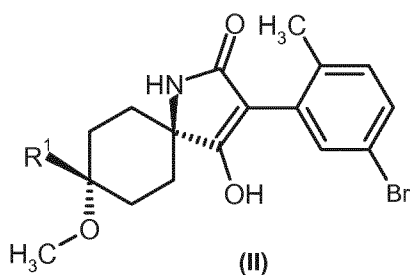
1. Syntheserouten für Verbindungen gemäß Formel (I)

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) können hergestellt werden mit den Syntheserouten A und/oder B.

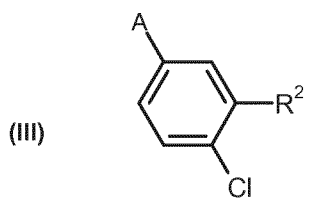
5

Syntheseroute A

Ein Arylbromid-Derivat der Formel (II)



10 in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, wird in einer Suzuki-Kupplung umgesetzt mit Verbindungen der Formel (III)



in welcher R^2 die oben angegebene Bedeutung hat und

A für $-B(OH)_2$, einen Boronsäure-Ester, bevorzugt Boronsäurepinakolester, oder $-BF_3 \cdot K^+$ steht.

15

Die Suzuki-Kupplungen erfolgen im Allgemeinen in inerten Lösungsmitteln, in Gegenwart eines Katalysators, gegebenenfalls in Gegenwart eines Zusatzreagenzes, bevorzugt in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 130 °C bei Normaldruck. Die Reaktionen können auch in einem geschlossenen Gefäß unter Erhitzen in der Mikrowelle durchgeführt werden.

20

Katalysatoren sind beispielsweise für Suzuki-Reaktionsbedingungen übliche Palladium-Katalysatoren, bevorzugt sind Katalysatoren wie z.B. Dichlorbis(triphenylphosphin)palladium, Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0), Palladium auf Kohle, Palladium(II)acetat, Palladium(II)acetat/Tris(cyclohexyl)phosphin, Palladium(II)acetoacetonat/Tri-tert-butylphosphoniumtetrafluoroborat, Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex oder Palladium(II)acetat mit einem Liganden wie Dicyclohexyl[2',4',6'-tri(propan-2-yl)biphenyl-2-yl]phosphan.

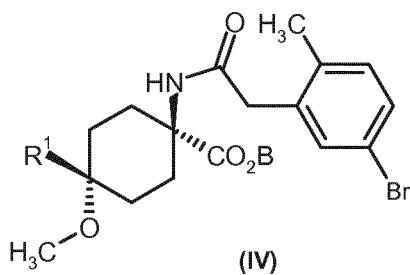
25

Zusatzreagenzien sind beispielsweise Kalium- oder Cäsiumacetat, Cäsium-, Kalium- oder Natriumcarbonat, Kalium-tert-butylat, Cäsiumfluorid, Kaliumphosphat oder Natrium- oder Kaliumhydroxid, bevorzugt sind Zusatzreagenzien wie z.B. Cäsiumcarbonat und/oder wässrige Natriumhydroxid-Lösung.

- 5 Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Ether wie Dioxan, Tetrahydrofuran oder 1,2-Dimethoxyethan, Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Xylol oder Toluol, oder Carbonsäureamide wie Dimethylformamid, Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon, oder Alkylsulfoxide wie Dimethylsulfoxid, oder Gemische der Lösungsmittel mit Alkoholen wie Methanol oder Ethanol und/oder Wasser, bevorzugt ist 1,2-Dimethoxyethan.

10

Die Verbindungen der Formel (II) können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (IV)



in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung hat und

- 15 B für C₁-C₆-Alkyl, bevorzugt Ethyl oder Methyl, steht,

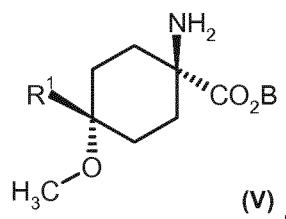
unter Dieckmann-Kondensations-Bedingungen umgesetzt.

- Die Dieckmann-Kondensationen erfolgen im Allgemeinen in inerten Lösungsmitteln in Gegenwart
20 einer Base, bevorzugt in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 130 °C bei Normaldruck.

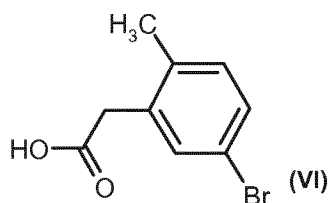
Basen sind beispielsweise Alkali- oder Erdalkalialkoholate wie Natrium- oder Kalium-tert-butylat, Natriummethanolat oder -ethanolat, bevorzugt ist Kalium-tert-butylat.

- Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Ether wie Dioxan, Tetrahydrofuran oder 1,2-
25 Dimethoxyethan, Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Xylol oder Toluol, oder Carbonsäureamide wie Dimethylformamid, Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon, oder Alkylsulfoxide wie Dimethylsulfoxid, oder Alkohole wie Methanol oder Ethanol, bevorzugt ist Dimethylformamid.

Die Verbindungen der Formel (IV) können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (V) oder ein Salz von Verbindungen der Formel (V)



in welcher R¹ und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit der Verbindung der Formel
5 (VI)



unter Amid-Kupplungs-Bedingungen umgesetzt.

Die Umsetzung erfolgt im Allgemeinen in inerten Lösungsmitteln, indem die Verbindungen der
10 Formel (VI) zunächst mit Thionylchlorid oder einem dem Fachmann bekannten äquivalenten Reagenz und in der zweiten Stufe mit Verbindungen der Formel (V) oder einem Salz der Verbindungen der Formel (V) in Gegenwart einer Base wie z. B. Triethylamin oder Kaliumcarbonat umgesetzt werden.

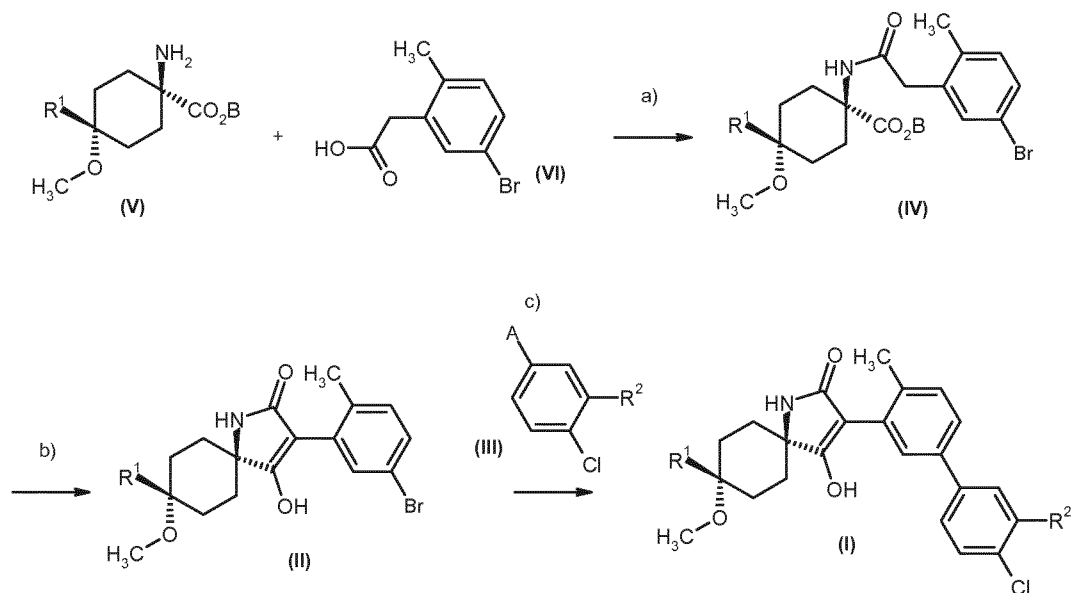
In einem alternativen Verfahren kann die Umsetzung in inerten Lösungsmitteln, in Gegenwart
15 eines Dehydratisierungsreagenzes, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, bevorzugt in einem Temperaturbereich von -30 °C bis 50 °C bei Normaldruck erfolgen.

Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan oder Trichlormethan, Kohlenwasserstoffe wie Benzol oder Toluol, Nitromethan, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Dimethylformamid oder Acetonitril. Ebenso ist es möglich, Gemische der Lösemittel
20 einzusetzen. Besonders bevorzugt sind Acetonitril, Dichlormethan, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran oder Toluol.

Basen sind beispielsweise Alkalicarbonat, wie z.B. Natrium- oder Kaliumcarbonat oder -hydrogencarbonat oder organische Basen wie Trialkylamine, z.B. Triethylamin, *N*-Methylmorpholin, *N*-Methylpiperidin, 4-Dimethylaminopyridin oder Diisopropylethylamin.

- Als Dehydratisierungsreagenzien eignen sich hierbei beispielsweise Carbodiimide wie z.B. *N,N'*-Diethyl-, *N,N'*-Dipropyl-, *N,N'*-Diisopropyl-, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, *N*-(3-Dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC), *N*-Cyclohexylcarbodiimid-*N'*-propyloxymethyl-Polystyrol (PS-Carbodiimid) oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-*tert*-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxy-carbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroformat, oder Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphorylchlorid, oder *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), 2-(2-Oxo-1-(2H)-pyridyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TPTU) oder *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat (HATU), oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), oder Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP), oder Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP), oder *N*-Hydroxysuccinimid, oder Mischungen aus diesen, mit Basen.
- Vorzugsweise wird die Kondensation mit PyBOP, TBTU oder mit EDC in Gegenwart von HOBt durchgeführt.

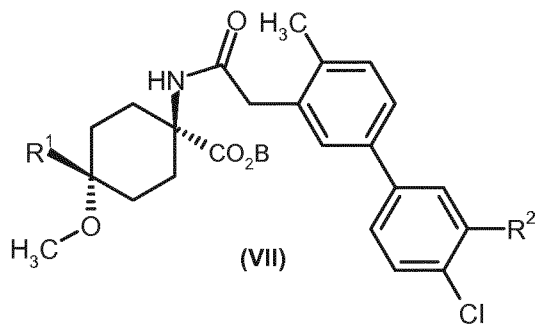
Das zuvor beschriebene Verfahren wird durch das folgende Syntheschema veranschaulicht:



- a): 1. SOCl_2 , 80 °C, 2. Triethylamin, Dichlormethan, Raumtemperatur;
- b): KOTBu, DMF, 80 °C;
- c): cat. Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex, Cs_2CO_3 , 1,2-Dimethoxyethan/Wasser, Rückfluss.

Syntheseroute B

Alternativ können die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (VII)

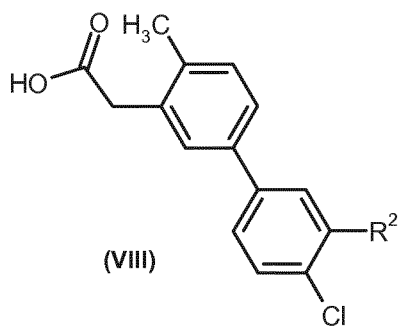


5

in welcher R^1 , R^2 und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, unter den oben angegebenen Bedingungen in einer Dieckmann-Kondensation umgesetzt.

Die Verbindungen der Formel (VII) können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (V) oder ein Salz von Verbindungen der Formel (V), in welcher R^1 und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit Verbindungen der Formel (VIII)

10



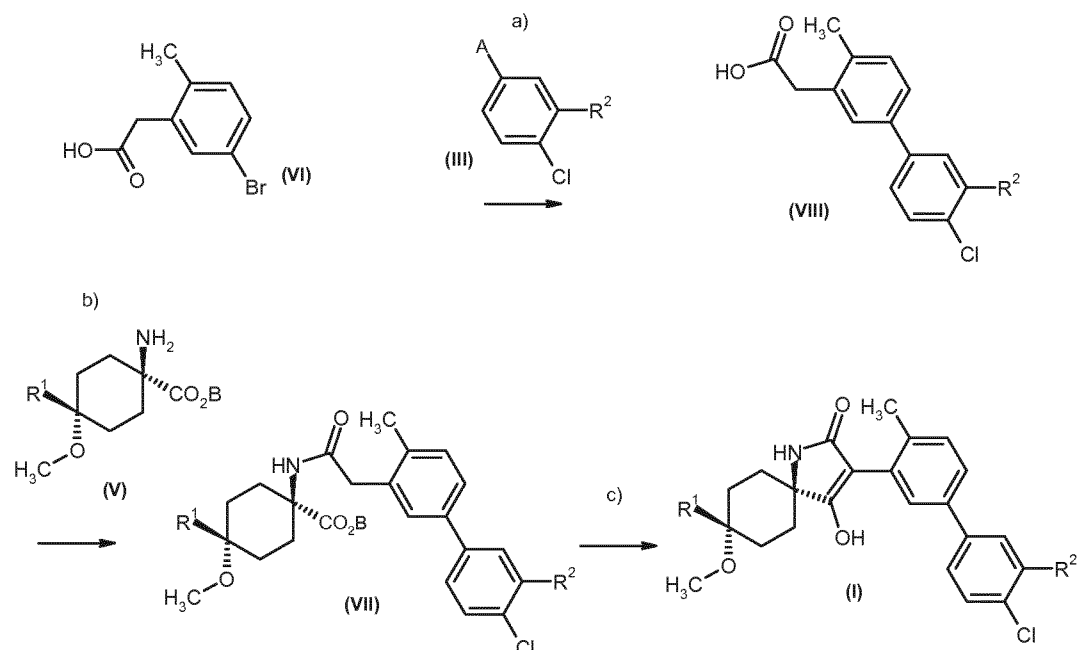
in welcher R^2 die oben angegebene Bedeutung hat, unter den oben angegebenen Amid-Kupplungs-Bedingungen umgesetzt.

15

Die Verbindungen der Formel (VIII) können hergestellt werden, indem man die Verbindung der Formel (VI) in einer Suzuki-Reaktion unter den oben angegebenen Bedingungen mit Verbindungen der Formel (III), in welcher R^2 und A die oben angegebenen Bedeutungen haben, umsetzt.

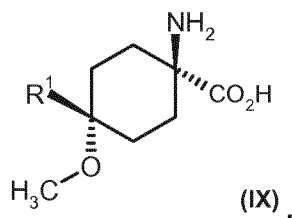
20

Das zuvor beschriebene Verfahren wird durch das folgende Syntheschema veranschaulicht:



- a): cat. Palladium(II)acetylacetonat, cat. Tri-tert-butylphosphoniumtetrafluoroborat, NaOH,
 5 THF/Wasser;
 b): 1. $SOCl_2$, 80 °C, 2. K_2CO_3 , Acetonitril, Raumtemperatur;
 c): $KOtBu$, DMF, Raumtemperatur.

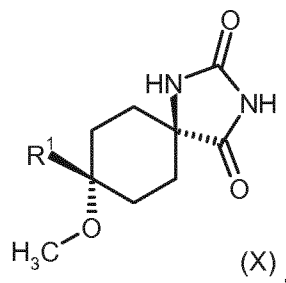
Die für Synthesroute A und B benötigten Verbindungen der Formel (V) oder Salze von
 10 Verbindungen der Formel (V), in welcher R^1 und B die oben angegebenen Bedeutungen haben,
 können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (IX) oder ein Salz von
 Verbindungen der Formel (IX)



15

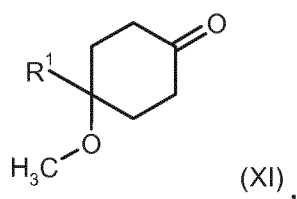
in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, nach bekannten Verfahren verestert, z.B.
 analog zu WO2002/02532 oder WO2010/063378.

Verbindungen der Formel (IX) oder Salze von Verbindungen der Formel (IX), in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung hat, können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (X)

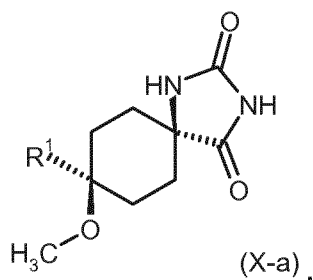


in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung hat, nach bekannten Verfahren spaltet, z.B. analog zu WO2002/02532 oder WO2010/063378.

10 Verbindungen der Formel (X), in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung hat, können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (XI)



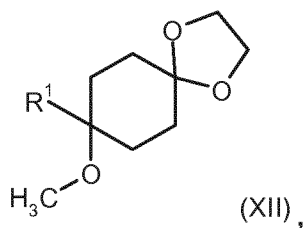
15 in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung hat, nach bekannten Verfahren in einer Bucherer-Bergs-Reaktion umgesetzt, z.B. analog zu WO2002/02532 oder WO2010/063378. Bei der Bildung des Hydantoin der Formel (X) bilden sich Isomerenmischungen aus dem cis-Isomer der Formel (X) und seinem trans-Isomer der Formel (X-a)



20 Die Abtrennung des trans-Isomers der Formel (X-a) kann bei diesem Syntheseschritt erfolgen. Alternativ kann die Isomerenmischung weiter umgesetzt werden und die Abtrennung der jeweiligen trans-isomeren Zwischenstufe bei einem der weiteren Syntheseschritte oder bei der Endstufe der Formel (I) erfolgen.

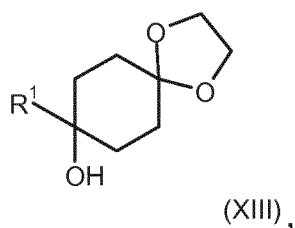
Alternativ lassen sich mit Hilfe der Strecker-Synthese nach bekannten Verfahren aus den Ketonen der Formel (XI) Aminonitrile herstellen, welche zu den Aminosäuren der Formel (IX) nach bekannten Verfahren hydrolysiert werden können.

- 5 Verbindungen der Formel (XI), in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (XII)



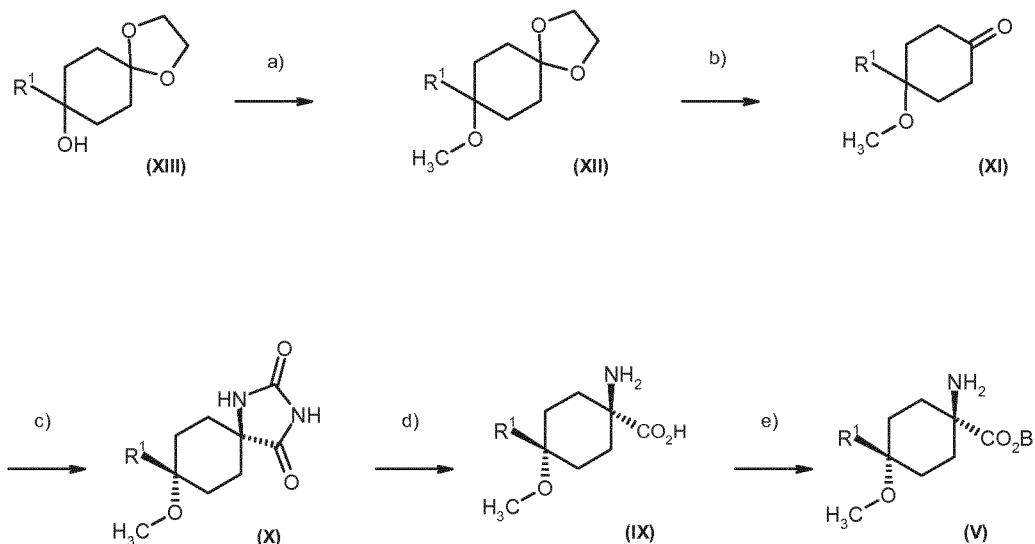
- in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, einer Ketalsspaltung unterwirft (siehe Protective
10 Groups in Organic Synthesis; Theodora W. Greene).

Verbindungen der Formel (XII), in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, können hergestellt werden, indem man Verbindungen der Formel (XIII)



- 15 in welcher R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, nach bekannten Verfahren methyliert, z.B. analog zu WO2010/063378.

Das zuvor beschriebene Verfahren wird durch das folgende Syntheschema veranschaulicht:



a): NaH, Methyljodid, THF, Raumtemperatur;

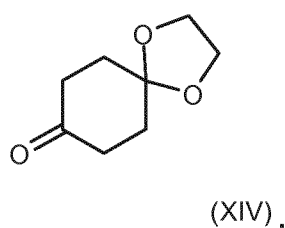
5 b): Toluolsulfonsäuremonohydrat, Aceton/Wasser;

c): NaCN, $(NH_4)_2CO_3$, Wasser/Ethanol, 60 °C;

d): KOH oder NaOH, Wasser, Rückfluss;

e): $SOCl_2$, Methanol, 40 °C bis Rückfluss.

- 10 Die Verbindung der Formel (XIII), in welcher R^1 für eine Trifluormethylgruppe steht, kann hergestellt werden, indem man die Verbindung der Formel (XIV)



mit (Trifluormethyl)trimethylsilan umgesetzt.

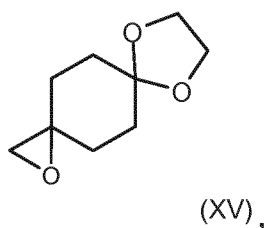
15

Die Umsetzung des Ketons der Formel (XIV) mit (Trifluormethyl)trimethylsilan zu den Verbindungen der Formel (XIII) erfolgt im Allgemeinen in inerten Lösungsmitteln, in Gegenwart eines Katalysators, bevorzugt in einem Temperaturbereich von -20 °C bis 100 °C bei Normaldruck. Katalysatoren sind beispielsweise Alkali- oder Erdalkalicarbonate wie Natrium-, Kalium- oder Cäsiumcarbonat. Desweiteren können Alkali-, Erdalkalifluoride wie Lithium- und Cäsiumfluorid sowie Fluoridsalze organischer Basen wie zum Beispiel Tetraethylammoniumfluorid oder

20

5 Tetrabutylammoniumfluorid zur Katalyse der gewünschten Reaktion verwendet werden. Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Ether wie Dioxan, Tetrahydrofuran oder 1,2-Dimethoxyethan, oder Carbonsäureamide wie Dimethylformamid, Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon, oder Alkylsulfoxide wie Dimethylsulfoxid, bevorzugt ist Dimethylformamid. Die primär anfallenden Silylderivate der Formel (XIII) werden abschließend gemäß dem Fachmann bekannten Methoden (siehe Protective Groups in Organic Synthesis; Theodora W. Greene) abgespalten.

10 Die Verbindung der Formel (XIII), in welcher R¹ für eine Methoxymethylgruppe steht, kann hergestellt werden, indem man das Epoxid der Formel (XV)



15 nach bekannten Verfahren öffnet, z.B. analog zu Rodriguez, Benjamin; Torre, Maria C. de la; Perales, Aurea; Malakov, Peter Y.; Papanov, Y.; et al., Tetrahedron, 1994, Band 50, Seiten 5451 - 5468.

Das Epoxid der Formel (XV) ist bekannt und kann aus der Verbindung der Formel (XIV) hergestellt werden (Ciaccio, James A.; Drahus, Antoinette L.; Meis, Regina M.; Tingle, Carice T.; Smrtka, Michael; Geneste, Richard, Synthetic Communications, 2003, Band 33, Seiten 2135 - 2144).

20

Abkürzungen und Akronyme:

ca.	circa
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. Th.	der Theorie (bei Ausbeute)
ELSD	Lichtstreuendetektor
ESI	Elektrospray-Ionisation (bei MS)
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruck-, Hochleistungsflüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
neg	negativ
NMR	Kernresonanzspektrometrie
pos	positiv
RP	Reversed-Phase (bei Chromatographie)
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit (bei HPLC)
tert	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

LC-MS- und HPLC-Methoden:5 Methode 1 (UPLC-MS):

Instrument: Waters Acquity UPLC-MS SQD 3001; Säule: Acquity UPLC BEH C18 1.7 50x2.1mm; Eluent A: Wasser + 0.1% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0-1.6 min 1-99% B, 1.6-2.0 min 99% B; Fluss 0.8 ml/min; Temperatur: 60 °C; Injektion: 2 µl; DAD scan: 210-400 nM; ELSD.

10

Methode 2 (UPLC-MS):

Instrument: Waters Acquity UPLC-MS SQD; Säule: Acquity UPLC BEH C18 1.7 50x2.1mm; Eluent A: Wasser + 0.05% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril + 0.05% Ameisensäure; Gradient: 0-1.6 min 1-99% B, 1.6-2.0 min 99% B; Fluss 0.8 ml/min; Temperatur: 60 °C; Injektion: 2 µl; DAD scan: 210-400 nm; ELSD.

15

Methode 3 (UPLC-MS):

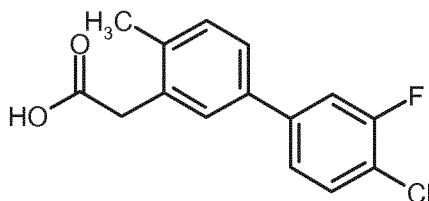
Instrument: Waters Acquity UPLC-MS ZQ4000; Säule: Acquity UPLC BEH C18 1.7 50x2.1mm; Eluent A: Wasser + 0.05% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril + 0.05% Ameisensäure; Gradient: 0-1.6 min 1-99% B, 1.6-2.0 min 99% B; Fluss 0.8 ml/min; Temperatur: 60 °C; Injektion: 2 µl; DAD scan: 210-400 nM

20

.

2. Herstellung der Vergleichs- und Ausführungsbeispiele**Ausgangsverbindungen und Intermediate:****5 Beispiel 1A**

(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)essigsäure



Zu einer Lösung von 40.0 g (175 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)essigsäure (EP 1791816 und
 10 WO 2006/29799) in einer Mischung aus 437 ml (437 mmol) entgaster 1N wässriger
 Natriumhydroxid-Lösung, 160 ml entgastem Wasser und 160 ml entgastem Tetrahydrofuran
 wurden unter Argon 33.5 g (192 mmol) (4-Chlor-3-fluorphenyl)boronsäure gegeben. Man rührte
 10 Minuten, versetzte mit 507 mg (1.75 mmol) Tri-tert-butylphosphoniumtetrafluoroborat und 532
 mg (1.75 mmol) Palladium(II)acetylacetonat und rührte 20 h bei Raumtemperatur. Anschließend
 15 gab man Toluol und Wasser hinzu, stellte mit konzentrierter, wässriger Hydrogenchlorid-Lösung
 einen pH-Wert von 1-2 ein, rührte 10 Minuten, trennte die Phasen, extrahierte zweimal mit Toluol,
 trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Der
 Rückstand wurde in 300 ml einer 6/1-Mischung aus n-Hexan/tert-Butyl-methylether 30 Minuten
 gerührt, abgesaugt, mit n-Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 38.0 g (78%
 20 d. Th.) der Titelverbindung.

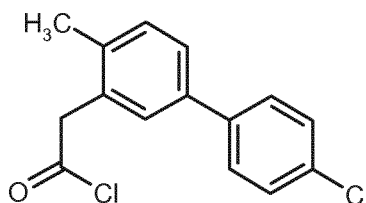
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.27 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 7.27 (d, 1H), 7.49 - 7.59 (m,
 3H), 7.61 - 7.75 (m, 2H), 12.4 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.31 min; MS (ESI $^-$): m/z = 277 $[\text{M-H}]^-$.

25

Beispiel 2A

(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetylchlorid



30

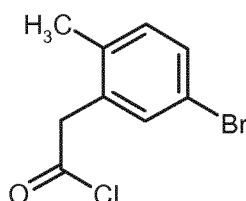
5.00 g (19.18 mmol) (4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)essigsäure (EP 2029531 A1 und US 2009/298828 A1) wurden in 36.51 g (306.84 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde vier Stunden bei 80 °C gerührt und anschließend im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung im Feinvakuum erhielt man 5.4 g (100% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

5

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.36 (s, 3H), 4.22 (s, 2H), 7.29 (d, 1H), 7.35 - 7.55 (m, 6H).

Beispiel 3A

10 (5-Brom-2-methylphenyl)acetylchlorid



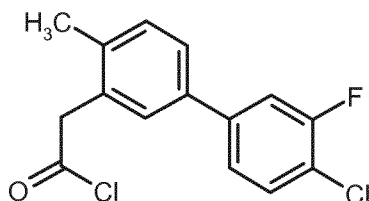
6.00 g (26.19 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)essigsäure (EP 1791816 A1 und WO 2006/29799 A1) wurden in 31.20 g (261.92 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde zwei
15 Stunden bei 80 °C gerührt und anschließend im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung im Feinvakuum erhielt man 6.29 g (97% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.26 (s, 3H), 4.12 (s, 2H), 7.09 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.37 (dd, 1H).

20

Beispiel 4A

(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetylchlorid

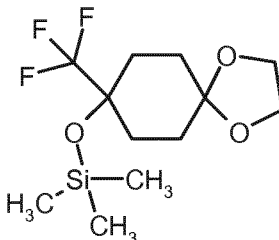


25 10.00 g (35.88 mmol) (4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)essigsäure (Beispiel 1A) wurden in 24.33 g (204.51 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei 80 °C gerührt und anschließend im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung im Feinvakuum erhielt man 10.54 g (99% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

30 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.36 (s, 3H), 4.22 (s, 2H), 7.26 - 7.39 (m, 4H), 7.41 - 7.49 (m, 2H).

Beispiel 5A

Trimethyl {[8-(trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl]oxy} silan



5

5.00 g (32.01 mmol) 1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-on wurden in 50 ml 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit 14.60 g (44.82 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt. Zur resultierenden Suspension tropfte man bei einer Innentemperatur von weniger als 30 °C 36.42 g (256.11 mmol) Trimethyl(trifluormethyl)silan, gelöst in 100 ml 1,2-Dimethoxyethan, und rührte das
 10 Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wurden ca. 600 ml Wasser zum Ansatz getropft, und das Zielmolekül wurde mittels Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung erhielt man 10.6 g (100% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

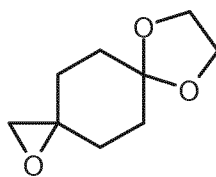
15

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 0.11 (s, 9H), 1.57 - 1.78 (m, 8H), 3.85 (s, 4H).

Beispiel 6A

1,7,10-Trioxadispiro[2.2.4.2]dodecan

20



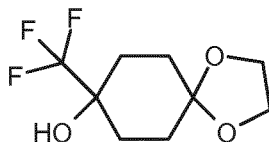
Zu einer homogenen Mischung von 50.7 g (231 mmol) Trimethylsulfoxoniumiodid und 25.9 g (231 mmol) Kalium-tert-butylat wurde eine Lösung aus 30.0 g (192 mmol) 1,4-Cyclohexandionmonoethlenacetal in 750 ml Dichlormethan gegeben und die Reaktionsmischung
 25 eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Man versetzte mit Eiswasser, trennte die Phasen, extrahierte die wässrige Phase mehrfach mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mehrfach mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 28.3 g (87% d. Th.) der Titelverbindung.

30

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.41 - 1.52 (m, 2H), 1.65 - 1.76 (m, 6H), 2.61 (s, 2H), 3.88 (s, 4H).

Beispiel 7A

8-(Trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol



5

12.20 g (40.89 mmol) Trimethyl{[8-(trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl]oxy}silan (Beispiel 5A) wurden bei 0 °C in 164 ml 1 molarer Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurden ca. 600 ml Wasser zum Ansatz gegeben, und das Zielmolekül wurde mittels Dichlormethan extrahiert.

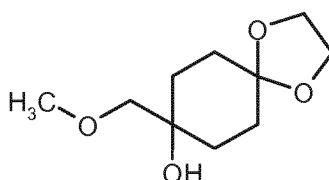
10 Die organische Phase wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung erhielt man 9.33 g (100% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.49 - 1.58 (m, 2H), 1.59 - 1.77 (m, 6H), 3.83 (s, 4H),

15 5.78 (s, 1H).

Beispiel 8A

8-(Methoxymethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol



20

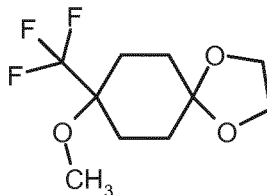
4.56 g (26.8 mmol) der Verbindung aus Beispiel 6A wurden in 150 ml Methanol mit 75 ml einer 25%igen methanolischen Natriummethylat-Lösung versetzt und über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt, der Rückstand in gesättigter, wässriger Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und mehrfach mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Man erhielt 3.23 g (60% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 - 1.47 (m, 4H), 1.50 - 1.63 (m, 2H), 1.68 - 1.80 (m, 2H), 3.10 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.82 (s, 4H), 4.24 (s, 1H).

30

Beispiel 9A

8-Methoxy-8-(trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan

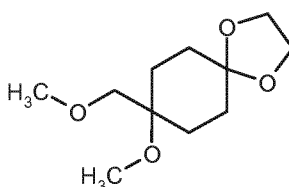


- 5 16.23 g (71.75 mmol) 8-(Trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (Beispiel 7A) wurden bei 0 °C in 582 ml Tetrahydrofuran gelöst, portionsweise mit 5.74 g (143.50 mmol) Natriumhydrid (60%ig in Paraffinöl) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur resultierenden Suspension wurden 50.92 g (358.76 mmol) Iodmethan getropft, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung goss man auf ca. 1 L Eiswasser und
- 10 extrahierte das Produkt mit Dichlormethan. Die organische Phase wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach Trocknung erhielt man 17.34 g (100% d. Th.) der Titelverbindung als bräunliches Öl.

- ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.50 - 1.75 (m, 6H), 1.85 - 1.98 (m, 2H), 3.30 (s, 3H),
- 15 3.84 (s, 4H).

Beispiel 10A

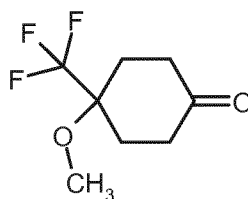
8-Methoxy-8-(methoxymethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan



- 20 3.40 g (16.8 mmol) der Verbindung aus Beispiel 8A wurden in 170 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 1.01 g (25.2 mmol) Natriumhydrid (60%ig in Paraffinöl) versetzt und 0.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend gab man 3.58 g (25.2 mmol) Iodmethan hinzu und rührte das Reaktionsgemisch zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend gab man 3.58 g (25.2
- 25 mmol) Iodmethan hinzu und rührte das Reaktionsgemisch zwei Stunden bei Raumtemperatur. Man versetzte mit Wasser, extrahierte mehrfach mit Essigsäureethylester, trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 3.35 g (92% d. Th.) der Titelverbindung.
- 30 ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 - 1.77 (m, 8H), 3.11 (s, 3H), 3.25 (s, 5H), 3.83 (s, 4H).

Beispiel 11A

4-Methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexanon



5

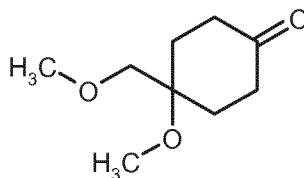
11.80 g (49.12 mmol) 8-Methoxy-8-(trifluormethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan (Beispiel 9A) wurden in 236 ml Aceton und 118 ml Wasser gelöst, mit 1.50 g (7.86 mmol) 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt und über Nacht refluxiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 1.2 L Wasser gegossen und das Produkt mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der resultierende Rückstand wurde im Vakuum destilliert (Siedepunkt: 106-110 °C bei 40 mbar). Man erhielt 6.86 g (71% d. Th.) der Titelverbindung als gelbliches Öl.

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.90 - 2.07 (m, 2H), 2.26 - 2.43 (m, 4H), 2.48 - 2.65 (m, 2H), 3.52 (s, 3H).

15

Beispiel 12A

4-Methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexanon



20

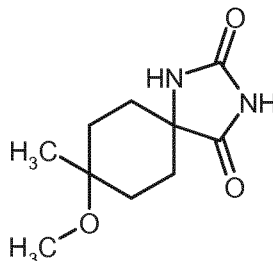
13.3 g (61.5 mmol) der Verbindung aus Beispiel 10A wurden in 200 ml Aceton und 100 ml Wasser gelöst, mit 1.87 g (9.84 mmol) 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Aceton abdestilliert, der wässrige Rückstand durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit 23.2 g Natriumchlorid versetzt. Man extrahierte mehrfach mit Essigsäureethylester, wusch die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung, trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 10.3 g (97% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.61 - 1.76 (m, 2H), 1.97 - 2.12 (m, 4H), 2.34 - 2.46 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.36 (s, 2H).

30

Beispiel 13A

8-Methoxy-8-methyl-1,3-diazaspiro[4.5]decan-2,4-dion



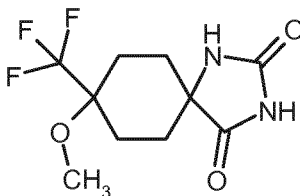
5

608 g (6.33 mol) Ammoniumcarbonat und 68.2 g (1.39 mmol) Natriumcyanid wurden in 2800 ml Wasser gelöst. Man tropfte 180 g (1.27 mmol) 4-Methoxy-4-methylcyclohexanon (beschrieben in WO 2010/063378) bei Raumtemperatur hinzu und rührte über Nacht bei 60 °C. Der Feststoff wurde abgesaugt und getrocknet. Man erhielt 169.6 g (19% d. Th.) der Titelverbindung als 4/1-trans/cis-Diastereomerenmischung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

10

Beispiel 14A

8-Methoxy-8-(trifluormethyl)-1,3-diazaspiro[4.5]decan-2,4-dion



15

8.80 g (44.86 mmol) 4-Methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexanon (Beispiel 11A), 4.40 g (89.72 mmol) Natriumcyanid und 17.24 g (179.44 mmol) Ammoniumcarbonat wurden in 102 ml Ethanol und 102 ml Wasser suspendiert. Die resultierende Suspension wurde 20 Stunden bei 60 °C gerührt. Das ausgeschiedene Produkt wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 10.05 g (84% d. Th.) der Titelverbindung als weißes Pulver.

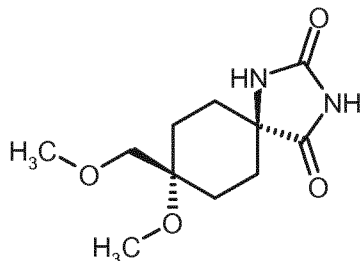
20

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.38 - 2.20 (m, 8H), 3.31 (s, 3H), 7.87 (s, 0.25H), 8.70 (s, 0.75H), 10.64 (s, 1H).

25

Beispiel 15A

(5r,8r)-8-Methoxy-8-(methoxymethyl)-1,3-diazaspiro[4.5]decan-2,4-dion

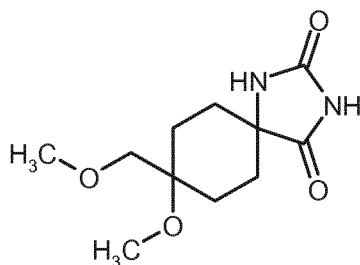


- 5 28.6 g (298 mmol) Ammoniumcarbonat und 3.21 g (65.5 mmol) Natriumcyanid wurden in 130 ml Wasser gelöst. Man tropfte 10.3 g (59.5 mmol) der Verbindung aus Beispiel 12A bei Raumtemperatur hinzu und rührte über Nacht bei 60 °C. Der Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt 8.67 g (60% d. Th.) der Titelverbindung.
- 10 ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.26 - 1.34 (m, 2H), 1.39 - 1.50 (m, 2H), 1.71 - 1.88 (m, 4H), 3.12 (s, 3H), 3.23 (s, 2H), 3.26 (s, 3H), 8.43 (s, 1H), 10.54 (s, 1H).

Beispiel 16A

8-Methoxy-8-(methoxymethyl)-1,3-diazaspiro[4.5]decan-2,4-dion

15

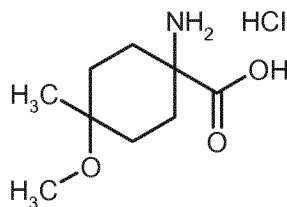


- 5.74 g (59.7 mmol) Ammoniumcarbonat und 1.46 g (29.8 mmol) Natriumcyanid wurden in 33 ml Wasser gelöst. Man tropfte 2.57 g (14.9 mmol) einer Lösung der Verbindung aus Beispiel 12A in
- 20 33 ml Ethanol bei Raumtemperatur hinzu und rührte über Nacht bei 60 °C. Man engte die Reaktionsmischung auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens ein, extrahierte mehrfach mit Dichlormethan und Essigsäureethylester, trocknete die organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 675 mg (19% d. Th.) der Titelverbindung als Diastereomerenmischung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

25

Beispiel 17A

1-Amino-4-methoxy-4-methylcyclohexancarbonsäurehydrogenchlorid



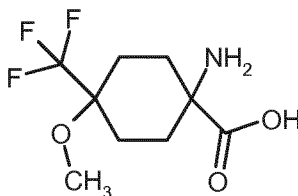
5

169.5 g der Verbindung aus Beispiel 13A wurden in 970 ml 30%iger wässriger Kaliumhydroxid-Lösung 20 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 670 ml konzentrierter, wässriger Hydrogenchlorid-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt, der Niederschlag abgesaugt und das Filtrat eingengt. Man erhielt 110.7 g eines Rohproduktes als Diastereomerenmischung, dass noch Salze enthält und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

15

Beispiel 18A

1-Amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarbonsäure

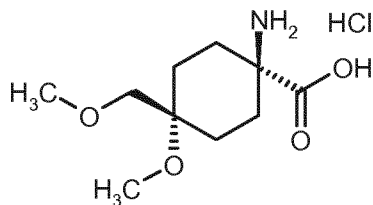


10.00 g (37.56 mmol) 8-Methoxy-8-(trifluormethyl)-1,3-diazaspiro[4.5]decan-2,4-dion (Beispiel 14A) wurden in 125 ml 3 molarer wässriger Natriumhydroxid-Lösung suspendiert und 3 Tage unter Rückflussbedingungen gerührt. Anschließend wurde mit konzentrierter wässriger Salzsäure ein pH-Wert von 6 eingestellt, das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 12.20 g (135% d. Th.; Produkt enthält anorganische Salze) der Titelverbindung als weißes Pulver.

¹H-NMR (400MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 1.64 - 1.79 (m, 3.6H), 1.89 - 2.08 (m, 2.4H), 2.24 - 2.40 (m, 2H), 3.40 (q, 0.5H), 3.42 (q, 2.5H).

Beispiel 19A

trans-1-Amino-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarbonsäurehydrogenchlorid



5

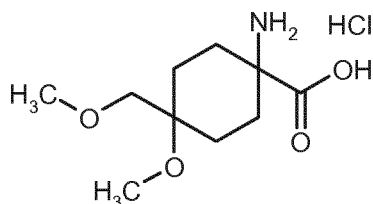
8.67 g (35.8 mmol) der Verbindung aus Beispiel 15A wurden in 52 ml 30%iger wässriger Kaliumhydroxid-Lösung 36 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingengt, durch Zugabe von konzentrierter, wässriger Hydrogenchlorid-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und
 10 komplett eingengt. Man erhielt 40.4 g eines Rohproduktes, dass noch Salze enthält und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.57 - 1.77 (m, 6H), 1.87 - 2.05 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.27 (s, 2H), 8.50 (s, 3H).

15

Beispiel 20A

1-Amino-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarbonsäurehydrogenchlorid

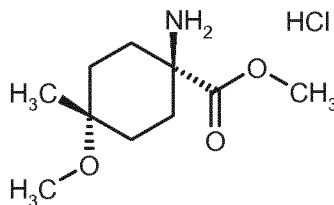


20

670 mg der Verbindung aus Beispiel 16A wurden in 4 ml 30%iger wässriger Kaliumhydroxid-Lösung 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingengt, durch Zugabe von konzentrierter, wässriger Hydrogenchlorid-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und eingengt. Man erhielt 4.70 g
 25 eines Rohproduktes als Diastereomerenmischung, dass noch Salze enthält und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

Beispiel 21A

Methyl-trans-1-amino-4-methoxy-4-methylcyclohexancarboxylathydrochlorid



5

Zu 110.5 g der Verbindung aus Beispiel 17A in 2500 ml Methanol unter Stickstoff wurden bei 5 °C 172 ml (2.36 mol) Thionylchlorid getropft. Man rührte 30 Minuten bei 0 °C und 24 Stunden bei 40 °C. Nach dem Abkühlen saugte man den Feststoff ab, engte das Filtrat ein, rührte den Rückstand 10 Minuten in einer Mischung aus 1000 ml Methyl-tert-butylether und 300 ml

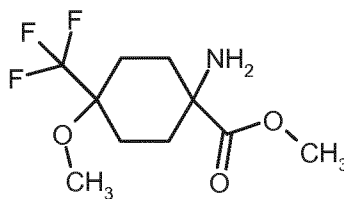
10 Acetonitril und saugte den Feststoff ab. Man erhielt 37.1 g (12% d. Th. ausgehend von 4-Methoxy-4-methylcyclohexanon aus Beispiel 13A) der Titelverbindung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.08 (s, 3H), 1.60 - 1.79 (m, 6H), 1.94 - 2.11 (m, 2H),

15 3.07 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 8.68 (s, 3H).

Beispiel 22A

Methyl-1-amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat



20

12.20 g (entspricht ca. 37.58 mmol) 1-Amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarbonsäure (Beispiel 18A) wurden in 210 ml Methanol suspendiert und bei 0 °C mit 10.4 ml (142.80 mmol) Thionylchlorid versetzt. Man kochte 2 Stunden unter Rückfluss, kühlte ab, versetzte bei 0 °C

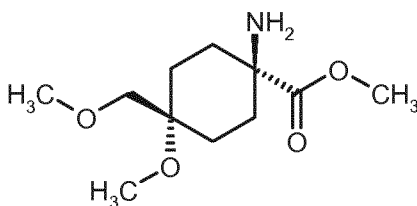
25 erneut mit 10.4 ml (142.80 mmol) Thionylchlorid und kochte weitere 2 Stunden unter Rückfluss. Der Ansatz wurde abgekühlt, nochmals mit 10.4 ml (142.80 mmol) Thionylchlorid versetzt und refluxierte zur Vervollständigung der Umsetzung über Nacht. Zur Aufarbeitung wurden ca. 100 ml Methanol abdestilliert und das Konzentrat auf 1 L gesättigte, wässrige Natriumcarbonat-Lösung gegossen. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert, und die organische Phase wurde über

Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen erhielt man 7.01 g (73% d. Th.) der Titelverbindung als gelbliches Öl.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.39 - 2.00 (m, 10H), 3.28 (q, 3H), 3.59 (s, 2.4H), 3.60 (s, 0.6H).

Beispiel 23A

Methyl-trans-1-amino-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat



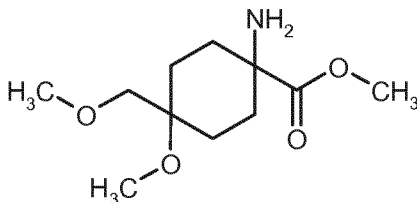
10

Zu 40.4 g der Verbindung aus Beispiel 19A in 400 ml Methanol wurden bei 0 °C 34.8 ml (478 mmol) Thionylchlorid getropft. Man rührte 0.5 Stunden bei 0 °C und 24 Stunden bei 40 °C. Nach dem Abkühlen engte man ein, nahm den Rückstand in Essigsäureethylester auf, wusch mit gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, extrahierte die wässrige Phase mehrfach mit Essigsäureethylester und Dichlormethan, trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 7.16 g (87% d. Th. ausgehend von Beispiel 15A) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.27 - 1.35 (m, 2H), 1.46 - 1.55 (m, 2H), 1.58 - 1.72 (m, 4H), 1.74 - 1.84 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.23 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.60 (s, 3H).

Beispiel 24A

Methyl-1-amino-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat



25

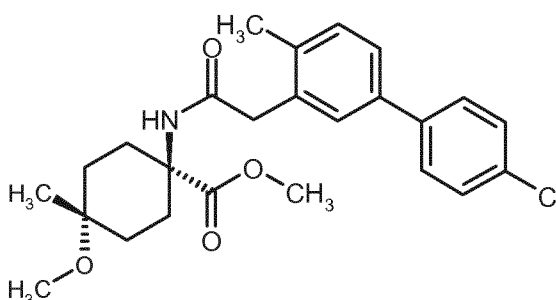
Zu 4.70 g der Verbindung aus Beispiel 20A in 50 ml Methanol wurden bei 0 °C 4.1 ml (55.60 mmol) Thionylchlorid getropft. Man rührte 0.5 Stunden bei 0 °C und über Nacht bei 40 °C. Nach

dem Abkühlen engte man ein, nahm den Rückstand in Essigsäureethylester auf, wusch mit gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, extrahierte die wässrige Phase mehrfach mit Essigsäureethylester, trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 392 mg (61% d. Th. ausgehend von Beispiel 16A) der
5 Titelerbindung als Diastereomerenmischung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

Beispiel 25A

Methyl-trans-1-{[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-methylcyclohexancarboxylat

10



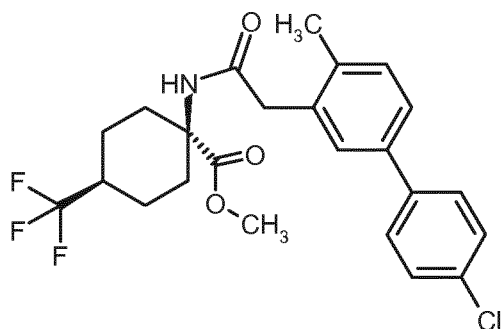
8.08 g (31.0 mmol) (4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)essigsäure (EP 2029531 A1 und US 2009/298828 A1) wurden in 12.9 ml (428 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch
15 wurde 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde in 70 ml Acetonitril gelöst. 6.00 g (25.2 mmol) der Verbindung aus Beispiel 21A wurden mit Essigsäureethylester und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Man trennte die Phasen, extrahierte die wässrige Phase mehrfach mit Essigsäureethylester, trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Der Rückstand wurde
20 in 120 ml Acetonitril mit 12.2 g (88.3 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man die Lösung des Säurechlorids hinzu und rührte zwei Tage bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm den Rückstand in Wasser auf, extrahierte mehrfach mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mehrfach mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, trocknete über Natriumsulfat,
25 filtrierte und engte ein. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt. Man erhielt 7.87 g (68% d. Th.) der Titelerbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 0.98 (s, 3H), 1.34 - 1.46 (m, 2H), 1.54 - 1.64 (m, 2H),
30 1.74 - 1.87 (m, 4H), 2.28 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 7.23 (d, 1H), 7.43 (dd, 1H), 7.47 - 7.53 (m, 2H), 7.55 (d, 1H), 7.61 - 7.68 (m, 2H), 8.23 (s, 1H).

LC-MS (Methode 2): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 444 [M+H]⁺.

Beispiel 26A

Methyl-cis-1-[[[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat



5

5.00 g (19.09 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylathydrochlorid (EP 1220841 A2 und WO 2001/23354 A3), 4.83 g (47.73 mmol) Triethylamin und 117 mg (0.955 mmol) N,N-Dimethylaminopyridin wurden bei Raumtemperatur in 40 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend tropfte man eine Lösung von 5.33 g (19.09 mmol) (4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetylchlorid (Beispiel 2A) in 40 ml Dichlormethan zum Ansatz. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, 5%-iger Citronensäure gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient). Nach Eindampfen und Trocknen wurden 6.36 g (71% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

15

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.35 - 1.80 (m, 6H), 2.05 - 2.18 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.25 - 2.40 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 7.19 (d, 1H), 7.40 (dd, 1H), 7.42 - 7.52 (m, 3H), 7.56 - 7.65 (m, 2H), 8.34 (s, 1H).

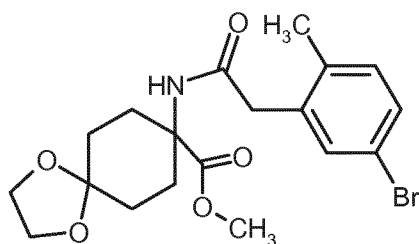
20

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.50 min; MS (ESIpos): m/z = 468 [M+H]⁺.

Beispiel 27A

Methyl-8-[[[(5-brom-2-methylphenyl)acetyl]amino]-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-carboxylat

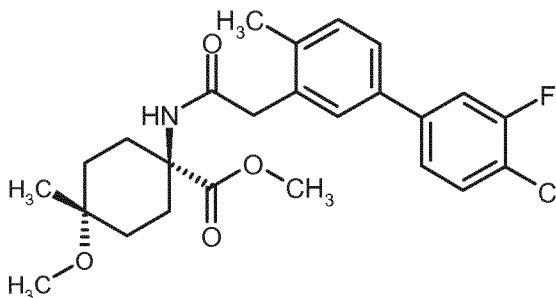
25



5.47 g (25.41 mmol) Methyl-8-amino-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-carboxylat [T. Satoh et al., Tetrahedron **63** (2007), 4806 - 4813], 3.86 g (38.12 mmol) Triethylamin und 155 mg (1.27 mmol) N,N-Dimethylaminopyridin wurden bei Raumtemperatur in 45 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend tropfte man eine Lösung von 6.29 g (25.41 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)acetylchlorid (Beispiel 3A) in 45 ml Dichlormethan zum Ansatz. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient/1% Triethylamin). Nach Eindampfen und Trocknen wurden 3.64 g (34% d. Th.) der Titelverbindung erhalten, die ohne weitere Charakterisierung in die Folgestufe eingesetzt wurde.

15 **Beispiel 28A**

Methyl-trans-1-{[(4'-chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-methylcyclohexancarboxylat



20

20.9 g (75.0 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1A wurden in 31.2 ml (428 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde in 200 ml Acetonitril gelöst. 16.0 g (67.3 mmol) der Verbindung aus Beispiel 21A wurden mit Essigsäureethylester und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Man trennte die Phasen, extrahierte die wässrige Phase mehrfach mit Essigsäureethylester, trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Der Rückstand wurde in 250 ml Acetonitril mit 28.5 g (206 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man die Lösung des Säurechlorids hinzu und rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm den Rückstand in Wasser auf, extrahierte mehrfach mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mehrfach mit 1N wässriger Hydrogenschlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung,

trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Zur weiteren Reinigung wurde erneut in Dichlormethan aufgenommen, mehrfach mit gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Man erhielt 23.6 g (76% d. Th.) der Titelverbindung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurden.

5

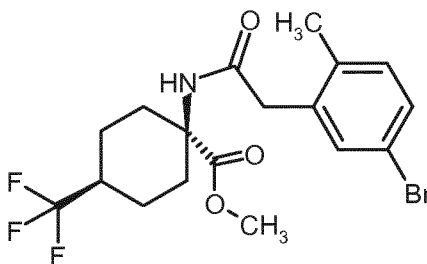
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 0.98 (s, 3H), 1.32 - 1.45 (m, 2H), 1.55 - 1.63 (m, 2H), 1.74 - 1.86 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 7.24 (d, 1H), 7.46 - 7.55 (m, 2H), 7.59 - 7.73 (m, 3H), 8.23 (s, 1H).

LC-MS (Methode 2): R_t = 1.46 min; MS (ESIpos): m/z = 462 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10

Beispiel 29A

Methyl-cis-1- $\{[(5\text{-brom-2-methylphenyl})\text{acetyl}]\text{amino}\}$ -4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat



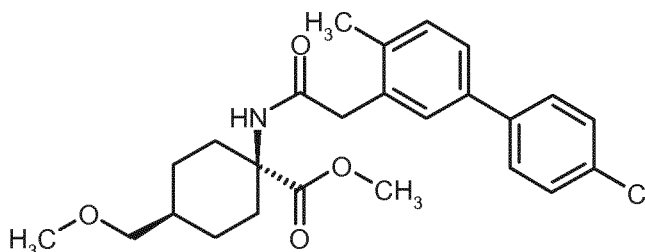
15

10.00 g (38.22 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylathydrochlorid (EP 1220841 A2 und WO 2001/23354 A3), 9.67 g (95.54 mmol) Triethylamin und 233 mg (1.91 mmol) N,N -Dimethylaminopyridin wurden bei Raumtemperatur in 95 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend tropfte man eine Lösung von 9.46 g (38.22 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)acetylchlorid (Beispiel 3A) in 95 ml Dichlormethan zum Ansatz. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit wässriger, 5%-iger Citronensäure gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluent: Dichlormethan/Methanolgradient). Nach Eindampfen und Trocknen wurden 8.84 g (53% d. Th.) der Titelverbindung erhalten, die ohne weitere Charakterisierung in die Folgestufe eingesetzt wurde.

25

Beispiel 30A

Methyl-cis-1-[[[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat



5

28.3 g (119 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylathydrochlorid (beschrieben in WO 2007/048545) wurden in 100 ml Wasser gelöst, mit 20.0 g (238 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt und mehrfach mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Man erhielt 9.88 g Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat. 5.93 g (29.4 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat in 50 ml Acetonitril wurden mit 7.46 g (54.0 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man eine Lösung aus 6.85 g (24.5 mmol) der Verbindung aus Beispiel 2A in 50 ml Acetonitril hinzu und rührte einen Tag bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, versetzte den Rückstand mit Wasser, extrahierte mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, trocknete über Magnesiumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 10.5 g der Titelverbindung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurden.

20

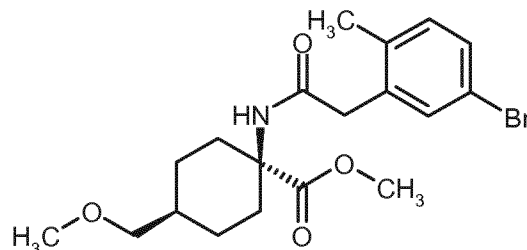
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.05 - 1.25 (m, 2H), 1.44 - 1.65 (m, 5H), 2.01 - 2.12 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 3.04 (d, 2H), 3.17 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 7.23 (d, 1H), 7.43 (dd, 1H), 7.47 - 7.57 (m, 3H), 7.62 - 7.68 (m, 2H), 8.21 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.43 min; MS (ESIpos): m/z = 444 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25

Beispiel 31A

Methyl-cis-1-[[[(5-brom-2-methylphenyl)acetyl]amino]-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat



5

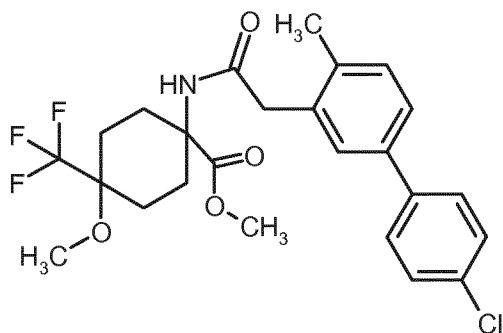
- 55.3 g (232 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylathydrochlorid (beschrieben in WO 2007/048545, Seite 144) wurden in 200 ml Wasser gelöst, mit 39.0 g (465 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt und mehrfach mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt.
- 10 Man erhielt 17.2 g Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat. 1.90 g (8.30 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)essigsäure (beschrieben in EP 1791816 und WO 2006/29799) wurden in 3.5 ml (47.3 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend eingengt. Man löste den Rückstand in 15 ml Acetonitril. 2.00 g (9.94 mmol) Methyl-cis-1-amino-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat in 20 ml Acetonitril wurden
- 15 mit 2.52 g (18.2 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man die Lösung des Säurechlorids hinzu und rührte 24 h bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, versetzte den Rückstand mit Wasser, extrahierte mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, trocknete über Magnesiumsulfat, filtrierte und engte ein. Man
- 20 erhielt 3.11 g (91% d. Th.) der Titelverbindung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurden.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.07 - 1.29 (m, 2H), 1.47 - 1.66 (m, 5H), 2.01 - 2.12 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 3.13 (d, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 7.10 (d, 1H), 7.30 (dd, 1H), 7.41 (d, 1H), 8.22 (s, 1H).

- 25 LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 412 [M+H]⁺.

Beispiel 32A

Methyl-1-{{[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat



5

3.94 g (15.44 mmol) Methyl-1-amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 22A) und 1.56 g (15.44 mmol) Triethylamin wurden in 56 ml Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung tropfte man 3.92 g (14.03 mmol) (4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetylchlorid (Beispiel 2A), gelöst in 56 ml Dichlormethan, und rührte das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit wässriger, 1%iger Citronensäure gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und getrocknet. Man erhielt 6.81 g (97% d. Th.) der Titelverbindung als weißes Pulver.

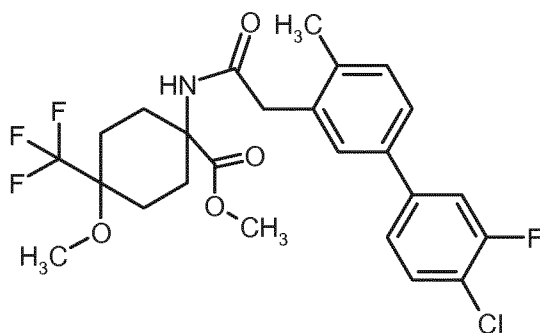
15

LC-MS (Methode 1): $R_t = 1.51$ min; MS (ESIpos): $m/z = 498$ $[M+H]^+$.

Beispiel 33A

Methyl-1-{{[(4'-chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat

20



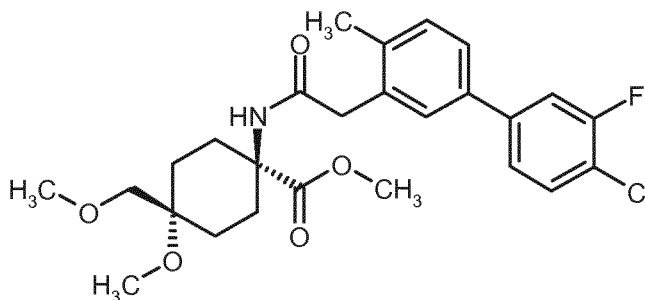
20.50 g (80.32 mmol) Methyl-1-amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 22A) und 8.13 g (80.32 mmol) Triethylamin wurden in 280 ml Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung tropfte man 21.70 g (73.02 mmol) (4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetylchlorid (Beispiel 4A), gelöst in 280 ml Dichlormethan, und rührte das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit wässriger, 1%iger Citronensäure gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und getrocknet. Man erhielt 37.05 g (98% d. Th.) der Titelverbindung als beiges Pulver.

10 LC-MS (Methode 1): $R_t = 1.51$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ $[M+H]^+$.

Beispiel 34A

Methyl-trans-1-{[(4'-chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat

15



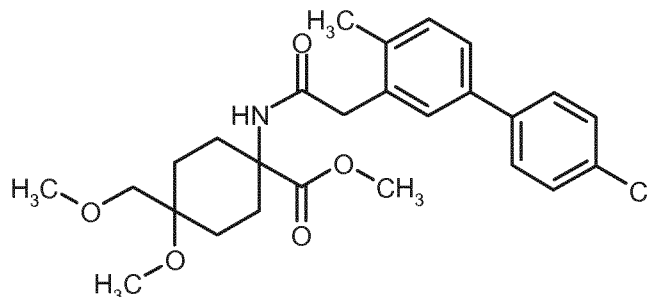
4.48 g (16.1 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1A wurden in 5.6 ml (76.4 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde in 20 ml Acetonitril gelöst. 3.10 g (13.4 mmol) der Verbindung aus Beispiel 23A in 30 ml Acetonitril wurden mit 6.48 g (46.9 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man die Lösung des Säurechlorids hinzu und rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend gab man auf Eiswasser, extrahierte mehrfach mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mehrfach mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 6.59 g (96% d. Th.) der Titelverbindung, die ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurden.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.32 - 1.49 (m, 2H), 1.54 - 1.66 (m, 2H), 1.70 - 1.91 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.14 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 7.24 (d, 1H), 7.46 - 7.56 (m, 2H), 7.58 - 7.74 (m, 3H), 8.27 (s, 1H).

LC-MS (Methode 2): $R_t = 1.38$ min; MS (ESIpos): $m/z = 492$ $[M+H]^+$.

Beispiel 35A

Methyl-1-[[[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(methoxymethyl)cyclohexancarboxylat

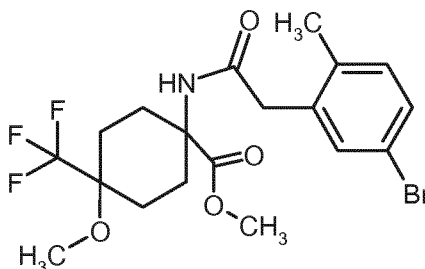


- 5 574 mg (2.20 mmol) (4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)essigsäure (EP 2029531 A1 und US 2009/298828 A1) wurden in 0.9 ml (12.5 mmol) Thionylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde in 5 ml Acetonitril gelöst. 390 mg (1.69 mmol) der Verbindung aus Beispiel 24A in 10 ml Acetonitril wurden mit 816 mg (5.90 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man die Lösung des
- 10 Säurechlorids hinzu und rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm in Eiswasser auf, extrahierte mehrfach mit Dichlormethan, wusch die vereinigten organischen Phasen mehrfach mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung und gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und engte ein. Man erhielt 570 mg der Titelverbindung als Diastereomerenmischung, die ohne weitere
- 15 Aufreinigung umgesetzt wurden.

LC-MS (Methode 2): $R_t = 1.36$ min; MS (ESIpos): $m/z = 474$ $[M+H]^+$.

Beispiel 36A

- 20 Methyl-1-[[[(5-brom-2-methylphenyl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat



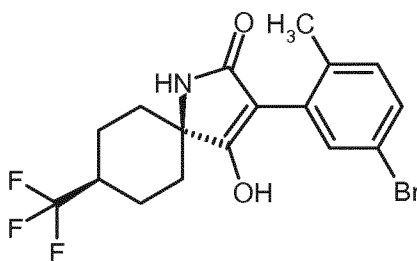
- 25 3.00 g (11.75 mmol) Methyl-1-amino-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 22A) und 1.19 g (11.75 mmol) Triethylamin wurden in 40 ml Dichlormethan gelöst. Zu dieser

- Lösung tropfte man 2.65 g (10.69 mmol) (5-Brom-2-methylphenyl)acetylchlorid (Beispiel 3A), gelöst in 40 ml Dichlormethan, und rührte das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit wässriger, 1%iger Citronensäure gewaschen.
- 5 Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde eingedampft und getrocknet. Man erhielt 4.79 g (87% d. Th.) der Titelverbindung als beiges Pulver.

LC-MS (Methode 1): $R_t = 1.33$ min; MS (ESIpos): $m/z = 468$ $[M+H]^+$.

10 **Beispiel 37A**

(5s,8s)-3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



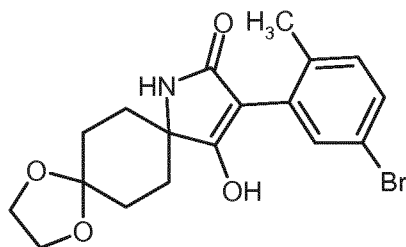
- 15 Zu 8.80 g (20.17 mmol) Methyl-cis-1-[[[(5-brom-2-methylphenyl)acetyl]amino]-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 29A) in 100 ml N,N-Dimethylformamid wurden 4.53 g (40.34 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 60 Minuten bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch auf 800 ml Eiswasser gegossen und mit wässriger Salzsäure angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert und durch
- 20 Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient). Nach Trocknen erhielt man 5.23 g (64% d. Th.) der Titelverbindung.

- $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.40 - 1.50 (m, 2H), 1.58 - 1.72 (m, 2H), 1.77 - 1.86 (m, 2H), 1.86 - 1.96 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.12 - 2.28 (m, 1H), 7.14 (d, 1H), 7.19 (d, 1H), 7.33 (dd,
- 25 1H), 8.33 (s, 1H), 11.01 (s, 1H).

LC-MS (Methode 3): $R_t = 1.18$ min; MS (ESIpos): $m/z = 406$ $[M+H]^+$.

Beispiel 38A

11-(5-Brom-2-methylphenyl)-12-hydroxy-1,4-dioxa-9-azadispiro[4.2.4.2]tetradec-11-en-10-on

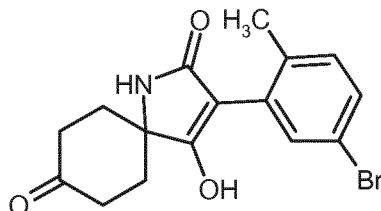


- 5 Zu 3.64 g (8.54 mmol) Methyl-8-[[5-brom-2-methylphenyl]acetyl]amino}-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-carboxylat (Beispiel 27A) in 43 ml N,N-Dimethylformamid wurden 1.92 g (17.08 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 30 Minuten bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch auf 500 ml Eiswasser gegossen und mit wässriger Salzsäure auf pH = 4 angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert. Nach Trocknen
- 10 erhielt man 2.49 g (74% d. Th.) der Titelverbindung, die ohne weitere Charakterisierung in die Folgestufe eingesetzt wurde.

Beispiel 39A

3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2,8-dion

15



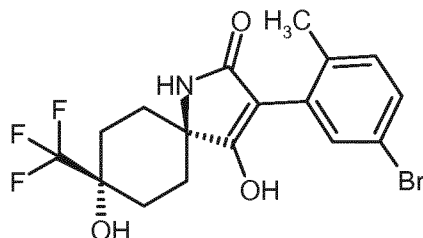
- Zu 2.49 g (6.32 mmol) 11-(5-Brom-2-methylphenyl)-12-hydroxy-1,4-dioxa-9-azadispiro[4.2.4.2]tetradec-11-en-10-on (Beispiel 38A) in 26 ml Aceton und 13 ml Wasser wurden 192 mg
- 20 (1.01 mmol) 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung über Nacht bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und Aceton am Rotationsverdampfer abgezogen. Das ausgeschiedene Rohprodukt wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft.
- 25 Nach Trocknen erhielt man 1.97 g (89% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.68 - 1.78 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.21 - 2.34 (m, 4H), 2.64 - 2.78 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.35 (dd, 1H), 8.53 (s, 1H), 11.12 (s, 1H).

- 30 LC-MS (Methode 3): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 352 [M+H]⁺.

Beispiel 40A

(5r,8r)-3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4,8-dihydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



5

Zu 400 mg (1.14 mmol) 3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2,8-dion (Beispiel 39A) in 8.3 ml N,N-Dimethylformamid wurden 521 mg (1.60 mmol) Cäsiumcarbonat und 975 mg (6.85 mmol) (Trifluormethyl)trimethylsilan gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung drei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit Wasser verdünnt, mit wässriger Zitronensäure auf pH = 4.5 angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 1 ml 4N wässriger Salzsäure versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Das Rohprodukt wurde mit Ethylacetat extrahiert, und die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet.

Der Rückstand wurde nach Eindampfen im Vakuum durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient). Nach Eindampfen und Trocknen erhielt man 367 mg (76% d. Th.) der Titelverbindung.

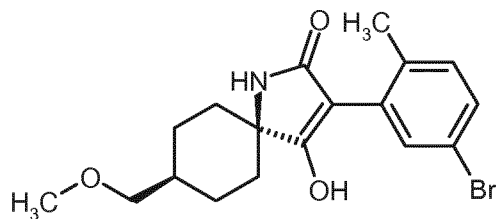
¹H-NMR (400MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 1.39 - 1.50 (m, 2H), 1.84 - 1.98 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.30 - 2.43 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.27 (d, 1H), 7.34 (dd, 1H).

20

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 420 [M+H]⁺.

Beispiel 41A

(5s,8s)-3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



25

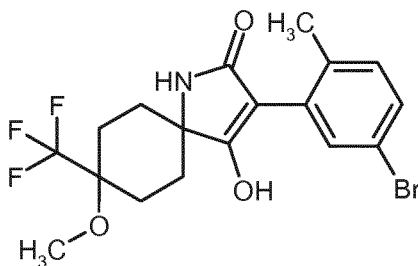
- Zu 3.11 g (7.54 mmol) der Verbindung aus Beispiel 31A in 11 ml N,N-Dimethylformamid wurden 1.69 g (15.1 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten bei 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen engte man ein, nahm den Rückstand in Wasser auf, tropfte 1N wässrige Hydrogenchlorid-Lösung hinzu und rührte 0.5 h. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit
- 5 Wasser gewaschen und getrocknet. Es wurden 2.83 g (96% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.22 - 1.44 (m, 4H), 1.46 - 1.63 (m, 1H), 1.65 - 1.75 (m, 2H), 1.80 - 1.85 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 3.15 (d, 2H), 3.23 (s, 3H), 7.17 (d, 1H), 7.22 (d, 1H), 7.36 (dd, 1H), 8.16 (s, 1H), 10.89 (s, 1H).

- 10 LC-MS (Methode 1): R_t = 1.05 min; MS (ESIpos): m/z = 380 [M+H]⁺.

Beispiel 42A

3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



15

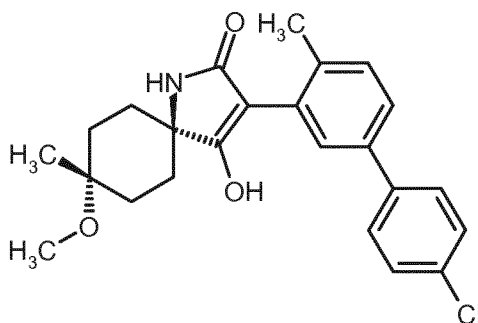
- Zu 4.70 g (10.08 mmol) Methyl-1-[(5-brom-2-methylphenyl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 36A) in 50 ml N,N-Dimethylformamid wurden 2.26 g (20.16 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 60 Minuten bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch auf 800 ml Eiswasser gegossen
- 20 und mit wässriger Salzsäure angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert und getrocknet. Man erhielt 3.68 g (84% d. Th.) der Titelverbindung als beiges Pulver.

¹H-NMR (400MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 1.39 - 2.45 (m, 11H), 3.42 - 3.46 (m, 3H), 7.12 - 7.18 (m, 1H), 7.25 - 7.29 (m, 1H), 7.32 - 7.38 (m, 1H).

25

Vergleichsbeispiele:**für Ausführungsbeispiel 1-1****V.1-a** (= Verbindung aus Tabelle 1, Zeile 20, S. 40 der WO10/063378)

- 5 (5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-methyl-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



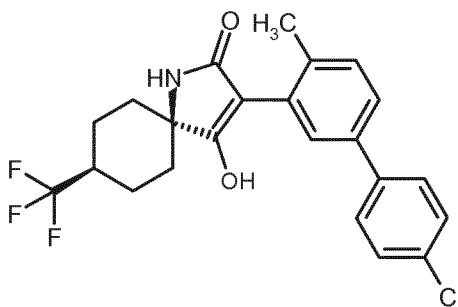
- Zu 7.83 g (17.6 mmol) der Verbindung aus Beispiel 25A in 75 ml N,N-Dimethylformamid wurden unter Stickstoff 2.18 g (19.4 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm den Rückstand in Eiswasser auf, säuerte mit 1N wässriger Hydrogenschlorid-Lösung an, rührte 30 Minuten, saugte ab, wusch mit Wasser und trocknete den Niederschlag. Zur weiteren Reinigung wurde das Produkt in 1N wässriger Natriumhydroxidlösung gelöst, filtriert, durch Ansäuern des Filtrats mit wässriger 1 N Salzsäure ausgefällt, mit Wasser gewaschen, abfiltriert und getrocknet.
- 15 Man erhielt 4.78 g (65% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.09 (s, 3H), 1.12 - 1.20 (m, 2H), 1.60 - 1.71 (m, 2H), 1.71 - 1.80 (m, 2H), 2.04 - 2.14 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 7.30 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.46 - 7.52 (m, 3H), 7.62 - 7.68 (m, 2H), 8.15 (s, 1H), 10.79 (s, 1H).

- 20 LC-MS (Methode 2): R_t = 1.23 min; MS (ESIpos): m/z = 412 [M+H]⁺.

V.1-b

(5s,8s)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



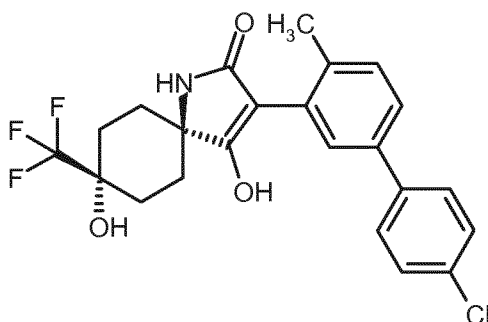
Zu 6.36 g (13.59 mmol) Methyl-cis-1-[[[4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl]acetyl]amino]-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 26A) in 68 ml N,N-Dimethylformamid wurden 3.05 g (27.18 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 60 Minuten bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch auf 800 ml Eiswasser gegossen und mit wässriger Salzsäure angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, getrocknet und durch Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Ethylacetatgradient) gereinigt. Nach Eindampfen erhielt man 4.1 g (69% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.40 - 1.55 (m, 2H), 1.58 - 1.77 (m, 2H), 1.78 - 2.02 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.17 - 2.30 (m, 1H), 7.27 (d, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.42 - 7.51 (m, 3H), 7.58 - 7.66 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 10.90 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 436 [M+H]⁺.

15 V.1-c

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4,8-dihydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



20

Zu 125 mg (0.30 mmol) (5r,8r)-3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4,8-dihydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on (Beispiel 40A) in 13 ml entgastem 1,2-Dimethoxyethan wurden unter Argon 24 mg (0.030 mmol) Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex gegeben. Man rührte 5 Minuten bei Raumtemperatur und setzte anschließend 70 mg (0.45 mmol) (4-Chlorphenyl)boronsäure und eine Lösung von 339 mg (1.04 mmol) Cäsiumcarbonat in 815 µl entgastem Wasser hinzu. Die Reaktionsmischung wurde 10 Minuten bei 150 °C im geschlossenen Gefäß unter Mikrowellenbestrahlung erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 100 µl konzentrierte, wässrige Hydrogenchlorid-Lösung zum Ansatz und dampfte im Vakuum ein. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit wässriger, 5%-iger Zitronensäure (pH = 4.0 - 4.5) und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man reinigte das Rohprodukt durch Chromatographie

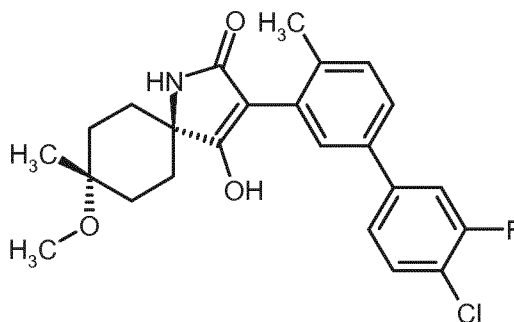
an Kieselgel (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient) sowie durch HPLC-Chromatographie (C18-Phase, Eluent: Wasser/Acetonitrilgradient/0.1% Ameisensäure) und erhielt 17.4 mg (13% d. Th.) der Titelverbindung.

- 5 ¹H-NMR (400MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 1.41 - 1.53 (m, 2H), 1.85 - 2.01 (m, 4H), 2.24 (s, 3H), 2.33 - 2.46 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 7.35 - 7.42 (m, 3H), 7.46 (dd, 1H), 7.58 ("d", 2H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.19 min; MS (ESIpos): m/z = 452 [M+H]⁺.

für Ausführungsbeispiel 1-2

- 10 **V.2-a** (= Verbindung aus Tabelle 2, Zeile 10, S. 45 der WO10/063378)
(5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-methyl-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



15

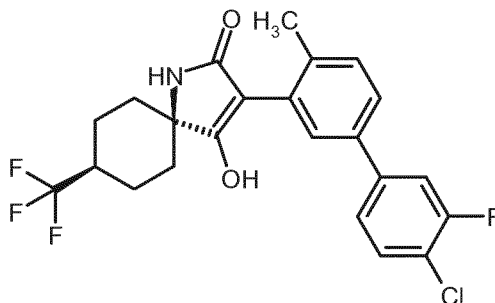
- Zu 23.5 g (50.4 mmol) der Verbindung aus Beispiel 28A in 250 ml N,N-Dimethylformamid wurden unter Stickstoff 6.22 g (55.4 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm den Rückstand in Wasser auf, säuerte mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung an, rührte 30
20 Minuten, saugte ab, wusch mit Wasser und trocknete den Niederschlag. Man erhielt 21.4 g (ca. 90% Reinheit, 89% d. Th.) der Titelverbindung.

- ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.08 (s, 3H), 1.10 - 1.22 (m, 2H), 1.56 - 1.81 (m, 4H), 1.99 - 2.14 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 7.29 (d, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.46 - 7.56 (m, 2H), 7.60
25 - 7.72 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 10.86 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 430 [M+H]⁺.

V.2-b

(5s,8s)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



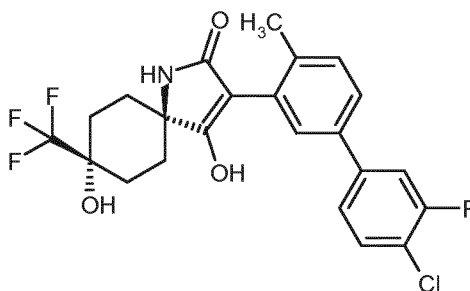
- 5 Zu 5.00 g (12.4 mmol) der Verbindung aus Beispiel 37A in 500 ml entgastem 1,2-Dimethoxyethan wurden unter Argon 1.01 g (1.24 mmol) Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex gegeben. Man rührte 5 Minuten bei Raumtemperatur und setzte anschließend 3.24 g (18.5 mmol) (4-Chlor-3-fluorphenyl)boronsäure und eine Lösung von 14.1 g (43.3 mmol) Cäsiumcarbonat in 30 ml entgastem Wasser hinzu. Die Reaktionsmischung wurde 2 h
- 10 unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 10 ml konzentrierte, wässrige Hydrogenchlorid-Lösung hinzu, trennte die wässrige Phase ab, versetzte mit Magnesiumsulfat, filtrierte über Kieselgel ab, wusch mit Essigsäureethylester nach und engte ein. Nach der Reinigung des Rohproduktes durch Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) und durch Kristallisation aus Essigsäureethylester erhielt
- 15 man 2.48 g (44% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.45 - 1.57 (m, 2H), 1.62 - 1.79 (m, 2H), 1.81 - 2.05 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.20 - 2.33 (m, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.49 - 7.58 (m, 2H), 7.64 (t, 1H), 7.70 (dd, 1H), 8.33 (s, 1H), 10.95 (s, 1H).

- 20 LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 454 [M+H]⁺.

V.2-c

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4,8-dihydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



Zu 125 mg (0.30 mmol) (5r,8r)-3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4,8-dihydroxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on (Beispiel 40A) in 13 ml entgastem 1,2-Dimethoxyethan wurden unter Argon 24 mg (0.030 mmol) Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex gegeben. Man rührte 5 Minuten bei Raumtemperatur und setzte anschließend 78 mg (0.45 mmol) (4-Chlor-3-fluorphenyl)boronsäure und eine Lösung von 340 mg (1.04 mmol) Cäsiumcarbonat in 815 µl entgastem Wasser hinzu. Die Reaktionsmischung wurde 10 Minuten bei 150 °C im geschlossenen Gefäß unter Mikrowellenbestrahlung erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 100 µl konzentrierte, wässrige Hydrogenchlorid-Lösung zum Ansatz und dampfte im Vakuum ein. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit wässriger, 5%-iger Zitronensäure (pH = 4.0 - 4.5) und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man reinigte das Rohprodukt durch Chromatographie an Kieselgel (Eluent: Hexan/Ethylacetatgradient) und erhielt 68 mg (49% d. Th.) der Titelverbindung.

15

¹H-NMR (300MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 1.41 - 1.56 (m, 2H), 1.85 - 1.99 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.32 - 2.48 (m, 2H), 7.10 - 7.25 (m, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.40 (dd, 1H), 7.43 - 7.56 (m, 3H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.19 min; MS (ESIpos): m/z = 470 [M+H]⁺.

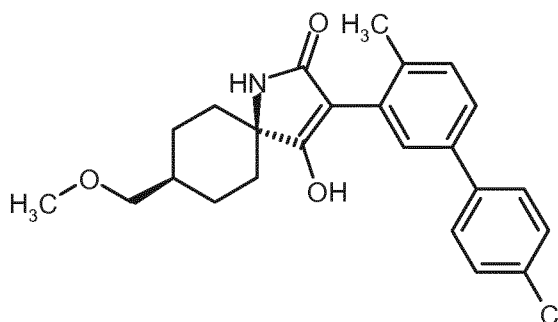
20 für Ausführungsbeispiel 1-3

V.3-a (=V.1-a) = Verbindung aus Tabelle 1, Zeile 20, S. 40 der WO10/063378

V.3-b

(5s,8s)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

25



Zu 10.4 g (23.4 mmol) der Verbindung aus Beispiel 30A in 35 ml N,N-Dimethylformamid wurden 5.26 g (46.9 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten bei 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen engte man ein, nahm den Rückstand in Wasser auf und tropfte

30

in 2N wässrige Hydrogenchlorid-Lösung. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt 9.3 g der Titelverbindung.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.21 - 1.47 (m, 4H), 1.48 - 1.64 (m, 1H), 1.65 - 1.78 (m, 2H), 1.81 - 1.97 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 3.16 (d, 2H), 3.24 (s, 3H), 7.30 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.44 - 7.53 (m, 3H), 7.61 - 7.68 (m, 2H), 8.13 (s, 1H), 10.77 (s, 1H).

LC-MS (Methode 3): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 412 [M+H]⁺.

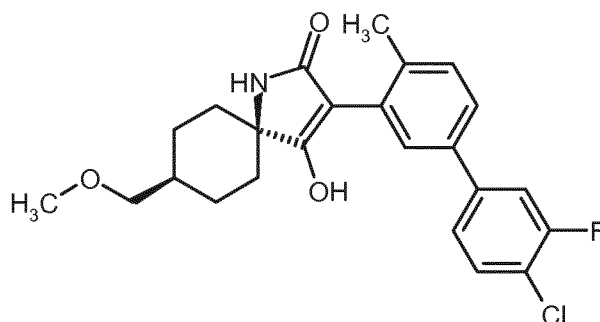
Die Substanz wurde als Isomerengemisch als Beispiel I-1-a-5 der WO 07/048545 offenbart.

10 für Ausführungsbeispiel 1-4

V.4-a (=V.2-a) = Verbindung aus Tabelle 2, Zeile 10, S. 45 der WO10/063378)

V.4-b

(5s,8s)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-(methoxymethyl)-1-
15 azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



Zu 2.00 g (5.26 mmol) der Verbindung aus Beispiel 41A und 215 mg (0.26 mmol) Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex in 213 ml entgastem 1,2-Dimethoxyethan wurden unter Argon 1.10 g (6.31 mmol) (4-Chlor-3-fluorphenyl)boronsäure und eine Lösung von 6.00 g (18.4 mmol) Cäsiumcarbonat in 13 ml entgastem Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 2.5 ml konzentrierte, wässrige Hydrogenchlorid-Lösung und Natriumsulfat hinzu, filtrierte über Kieselgel und Natriumsulfat ab, wusch mit Essigsäureethylester nach und engte ein. Man reinigte das Rohprodukt durch Chromatographie an Kieselgel (Eluent: Hexan/Essigsäureethylester-Gradient). Anschließend wurde mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung verrührt, mit konzentrierter, wässriger Hydrogenchlorid-Lösung sauer gestellt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt 1.50 g (65% d. Th.) der Titelverbindung.

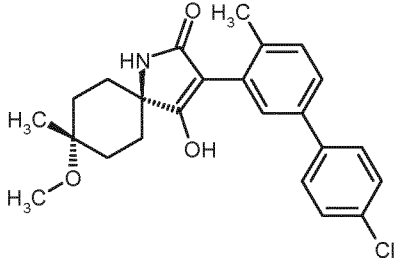
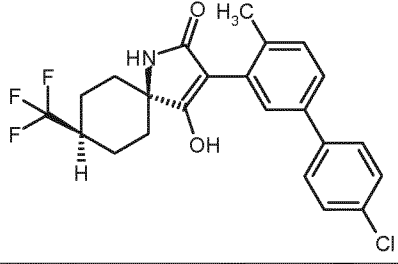
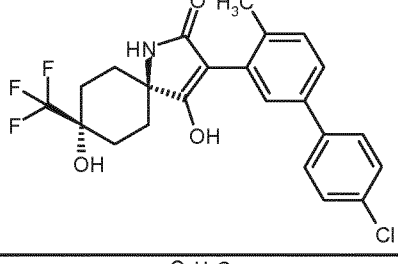
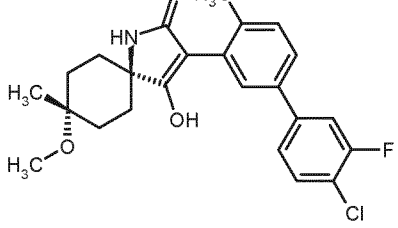
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6): δ [ppm]= 1.21 - 1.47 (m, 4H), 1.48 - 1.64 (m, 1H), 1.65 - 1.78 (m, 2H), 1.81 - 1.97 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 3.16 (d, 2H), 3.24 (s, 3H), 7.31 (d, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.48 - 7.57 (m, 2H), 7.60 - 7.74 (m, 2H), 8.13 (s, 1H), 10.79 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.26 min; MS (ESIpos): m/z = 430 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5

Tabelle V zeigen die Vergleichsbeispiele, welche die Anmelderin als den nächstliegenden Stand der Technik ansieht in der Übersicht.

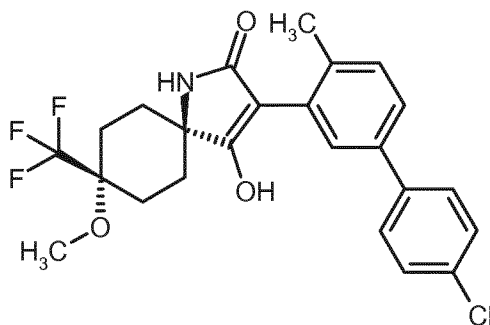
Tab. V

Bsp.	Struktur/Name	offenbart in
V.1-a		Tabelle 1, Zeile 20, S. 40 der WO10/063378
V.1-b		
V.1-c		
V.2-a		Tabelle 2, Zeile 10, S. 45 der WO10/063378

Bsp.	Struktur/Name	offenbart in
V.2-b		
V.2-c		
V.3-a		Tabelle 1, Zeile 20, S. 40 der WO10/063378
V.3-b		
V.4-a		Tabelle 2, Zeile 10, S. 45 der WO10/063378
V.4-b		

Ausführungsbeispiele:**Beispiel 1-1**

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



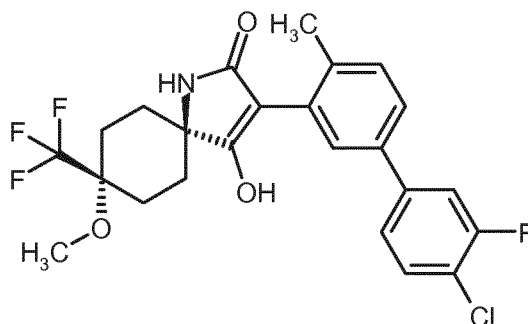
Zu 6.80 g (13.66 mmol) Methyl-1-{{[(4'-chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 32A) in 68 ml N,N-Dimethylformamid wurden 3.07 g (27.31 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 60 Minuten bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete Reaktionsgemisch auf 1500 ml Eiswasser gegossen und mit wässriger Salzsäure angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, getrocknet und durch Chromatographie (Säule: Chiralpak IA 5µm, 250x30mm; Hexan/Ethanol-Gradient in Gegenwart von 0.1% Ameisensäure) vorgereinigt. Man erhielt nach Eindampfen und Kristallisation aus Diethylether 3.57 g (56% d. Th.) der Titelverbindung.

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.25 - 1.41 (m, 2H), 1.83 - 1.99 (m, 4H), 2.00 - 2.14 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 7.28 (d, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.42 - 7.51 (m, 3H), 7.58 - 7.67 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 10.98 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.31 min; MS (ESIpos): m/z = 466 [M+H]⁺.

Beispiel 1-2

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



5

Zu 300.00 mg (0.69 mmol) 3-(5-Brom-2-methylphenyl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on (Beispiel 42A) in 28 ml entgastem 1,2-Dimethoxyethan wurden unter Argon 67.70 mg (0.083 mmol) Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium-Dichlormethan-Komplex gegeben. Man rührte 5 Minuten bei Raumtemperatur und setzte anschließend 216.83 mg (1.24 mmol) (4-Chlor-3-fluorphenyl)boronsäure und eine Lösung von 945.40 mg (2.90 mmol) Cäsiumcarbonat in 1 ml entgastem Wasser hinzu. Die Reaktionsmischung wurde 40 min in der Mikrowelle auf 150 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 0.4 ml konzentrierte, wässrige Hydrogenchlorid-Lösung hinzu, filtrierte, wusch den Niederschlag mit

10 Dichlormethan sowie mit Methanol und dampfte die vereinigten organischen Phasen im Vakuum ein. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) vorgereinigt. Die Endreinigung geschah durch RP-Chromatographie (Laufmittel: Wasser/Ameisensäure/Acetonitril-Gradient). Man erhielt 43 mg

15 (13% d. Th.) der Titelverbindung.

20

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.27 - 1.39 (m, 2H), 1.85 - 1.99 (m, 4H), 2.00 - 2.13 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 7.29 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.45 - 7.54 (m, 2H), 7.57 - 7.70 (m, 2H), 8.36 (s, 1H), 10.97 (s, 1H).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 484 [M+H]⁺.

25

Alternativ konnte die Zielstruktur wie folgt hergestellt werden:

Zu 35.00 g (67.84 mmol) Methyl-1-[(4'-chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)acetyl]amino}-4-methoxy-4-(trifluormethyl)cyclohexancarboxylat (Beispiel 33A) in 350 ml N,N-Dimethylformamid wurden 15.22 g (135.68 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die

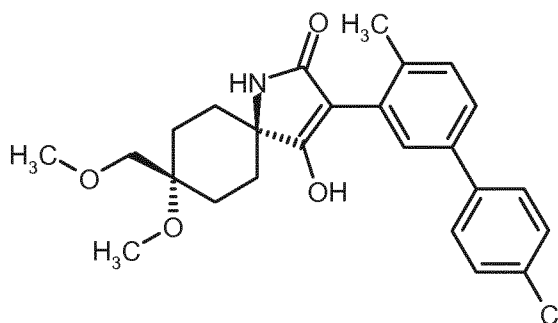
30 Reaktionsmischung 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wurde das erkaltete

Reaktionsgemisch auf 8000 ml Eiswasser gegossen und mit wässriger Salzsäure angesäuert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, getrocknet und durch Kieselgel-Chromatographie (Dichlormethan/Ethylacetat-Gradient) vorgereinigt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Diethylether kristallisiert. Man erhielt 9.33 g (28% d. Th.) der Titelverbindung.

5

Beispiel 1-3

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



10

Zu 570 mg (1.20 mmol) der Verbindung aus Beispiel 35A in 5 ml N,N-Dimethylformamid wurden unter Stickstoff 148 mg (1.32 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend engte man ein, nahm den Rückstand in Eiswasser auf, säuerte mit 1N wässriger Hydrogenchlorid-Lösung an, rührte 30 Minuten, saugte ab, wusch mit Wasser und trocknete den Niederschlag. Durch zweimalige präparative HPLC [1. Säule: Chromatorex C18, 10 µm, 125 mm x 30 mm; Eluent: Wasser/Acetonitril-Gradient unter Zusatz von 0.1% Ameisensäure; 2. Säule: Chiralpak IC, 5 µm, 250 mm x 20 mm; Eluent: Hexan/Ethanol = 80/20 unter Zusatz von 0.1% Ameisensäure; Fluss: 25 ml/min; Temperatur: RT] wurden die Diastereomere getrennt. Man erhielt 105 mg (20% d. Th.) der Titelverbindung.

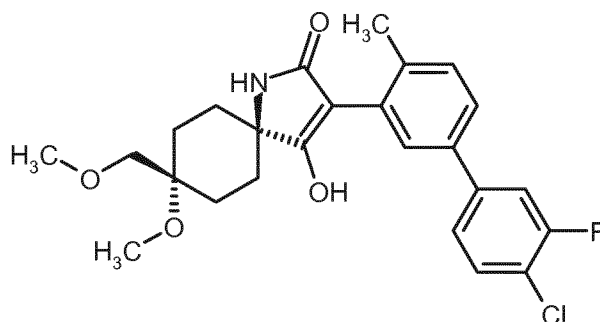
¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1.12 - 1.27 (m, 2H), 1.48 - 1.65 (m, 2H), 1.75 - 1.88 (m, 2H), 1.99 - 2.14 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.28 (m, 5H), 7.30 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.44 - 7.54 (m, 3H), 7.61 - 7.69 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 10.83 (s, 1H).

25

LC-MS (Methode 2): R_t = 1.19 min; MS (ESIpos): m/z = 442 [M+H]⁺.

Beispiel 1-4

(5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on



5

Zu 6.55 g (13.3 mmol) der Verbindung aus Beispiel 34A in 60 ml N,N-Dimethylformamid wurden unter Stickstoff 1.64 g (14.7 mmol) Kalium-tert-butylat gegeben. Man rührte die Reaktionsmischung 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend gab man das Reaktionsgemisch auf Eiswasser, tropfte 1N wässrige Hydrogenchlorid-Lösung bis zu einem pH-Wert von 1-2 hinzu, rührte 30 Minuten, saugte ab, wusch mit Wasser und trocknete den Niederschlag. Zur weiteren Reinigung wurde das Produkt in 1N wässriger Natriumhydroxid-Lösung gelöst, durch Ansäuern mit wässriger 1 N Salzsäure ausgefällt, 30 Minuten gerührt, mit Wasser gewaschen, abfiltriert und getrocknet. Man erhielt 6.00 g (98% d. Th.) der Titelverbindung.

15

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1.12 - 1.26 (m, 2H), 1.50 - 1.65 (m, 2H), 1.76 - 1.89 (m, 2H), 1.98 - 2.15 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.28 (s, 5H), 7.31 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 7.49 - 7.57 (m, 2H), 7.64 (t, 1H), 7.69 (dd, 1H), 8.14 (s, 1H), 10.82 (s, 1H).

20 LC-MS (Methode 2): R_t = 1.21 min; MS (ESIpos): m/z = 460 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3. Assays

3.1 Human ACC-Enzymassays

- 5 Die ACC1- und ACC2- Inhibitionsdaten wurden mit beiden im folgenden beschriebenen Assays erhoben. Normalerweise wurde für beide Messungen eine gemeinsame serielle Verdünnungsreihe der Testsubstanzen erstellt und von dieser Verdünnungsreihe dann mit einem 384well-50-nl-Kapillarpipettor (Hummingbird™ von Genomics Solutions) mehrere Substanzplattenkopien erstellt. Diese wurden dann jeweils in dem ACC1- und dem ACC2-Assay verwendet, so dass für
10 eine optimale Vergleichbarkeit beide Enzyminhibitionsmessungen mit Kopien derselben Substanzverdünnungsreihe durchgeführt wurden.

Human ACC1 Enzymassay

- 15 Die hACC1-inhibitorische Wirkung der Substanzen dieser Erfindung wurde in dem in den folgenden Absätzen beschriebenen hACC1-Assay gemessen.
Im Wesentlichen wird die Enzymaktivität gemessen durch Quantifizierung des als Nebenprodukt der Enzymreaktionen gebildeten Adenosin-di-phosphat (ADP) mittels des ADP-Glo™-Nachweissystems der Firma Promega. Bei diesem wird zunächst das in der Enzymreaktion nicht
20 verbrauchte Adenosin-tri-phosphat (ATP) mittels einer Adenylatzyclase („ADP-GLO-Reagenz“) quantitativ in cAMP überführt, die Adenylatzyklase dann gestoppt und anschließend („Kinase Detection Reagenz“) wird dann das gebildete ADP in ATP umgewandelt und dieses in einer luziferasebasierten Reaktion in ein Glow-Lumineszenzsignal umgesetzt.
Als Enzym wurde rekombinantes C-terminal FLAG-getagtes humanes ACC1 (Acetyl-Coenzym A
25 Carboxylase alpha Transkript Variante 1) (GenBank Accession No. NM_198834) (Aminosäuren 39 – Ende) verwendet, exprimiert in Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Hi5) und gereinigt durch Anti-FLAG-Affinitätschromatographie.

- Für den Assay wurden 50 nl einer 100fach konzentrierten Lösung der Testsubstanz in DMSO in
30 eine weiße low-volume 384well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert, 2,5 µl einer Lösung von hACC1 in Assaypuffer [50 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 2 mM Kaliumcitrat, 12 mM NaHCO₃, 2 mM Di-thio-threitol (DTT), 0,005% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA)] hinzugegeben und die Mischung für 15 min inkubiert, um eine Vorbindung der Substanzen an das Enzym vor der Enzymreaktion zu ermöglichen. Dann wurde die
35 Enzymreaktion gestartet durch Zugabe von 2,5 µl einer Lösung von Adenosin-tri-phosphat (ATP, 100 µM =>Endkonzentration in 5 µl Assayvolumen ist 50 µM) und Acetyl-CoA (20 µM =>Endkonzentration in 5 µl Assayvolumen ist 10 µM) in Assaypuffer und die resultierende

Mischung für die Reaktionszeit von 45 min bei 22°C inkubiert. Die Konzentration des hACC1 wurde an die jeweilige Aktivität des Enzyms angepasst und so eingestellt, dass der Assay im linearen Bereich arbeitete. Typische Konzentrationen lagen im Bereich von 1,75 ng/μl. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2,5 μl des „ADP-GLO-Reagenz“ (1:1,5-fach verdünnt) und die resultierende Mischung 1 h bei 22°C inkubiert, um das nicht umgesetzte ATP vollständig in cAMP zu überführen. Anschließend wurden 2,5 μl des „Kinase Detection Reagenz“ (1,2fach konzentrierter als vom Hersteller angegeben) zugegeben, die resultierende Mischung 1 h bei 22°C inkubiert und dann die Lumineszenz mit einem geeigneten Messgerät (Viewlux oder Topcount von Perkin-Elmer oder Pherastar von BMG Labtechnologies) gemessen. Die Menge des emittierten Lichtes wurde als Maß für die Menge des gebildeten ADP und damit für die Enzymaktivität der hACC1 genommen. Die Daten wurden normalisiert (Enzymreaktion ohne Inhibitor = 0 % Inhibition, alle anderen Assaykomponente aber kein Enzym = 100 % Inhibition). Üblicherweise wurden die Testsubstanz auf derselben Mikrotiterplatten bei 10 verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 20 μM bis 1 nM (20 μM, 6.7 μM, 2.2 μM, 0.74 μM, 0.25 μM, 82 nM, 27 nM, 9.2 nM, 3.1 nM and 1 nM, die Verdünnungsreihen wurden vor dem Assay hergestellt auf der Ebene der 100fach konzentrierten Lösung durch serielle 1:3 Verdünnungen) in Doppelwerten für jede Konzentration getestet und IC₅₀-Werte wurden kalkuliert mit einem 4-Parameter-Fit, wofür eine inhouse-Software verwendet wurde.

20 **Human ACC2 Enzymassay**

Die hACC2-inhibitorische Wirkung der Substanzen dieser Erfindung wurde in dem in den folgenden Absätzen beschriebenen hACC2-Assay gemessen. Im Wesentlichen wird die Enzymaktivität gemessen durch Quantifizierung des als Nebenprodukt der Enzymreaktionen gebildeten Adenosin-di-phosphat (ADP) mittels des ADP-Glo™-Nachweissystems der Firma Promega. Bei diesem wird zunächst das in der Enzymreaktion nicht verbrauchte Adenosin-tri-phosphat (ATP) mittels einer Adenylatzyclase („ADP-GLO-Reagenz“) quantitativ in cAMP überführt, die Adenylatzyclase dann gestoppt und anschließend („Kinase Detection Reagenz“) wird dann das gebildete ADP in ATP umgewandelt und dieses in einer luziferasebasierten Reaktion in ein Glow-Lumineszenzsignal umgesetzt.

Als Enzym wurde rekombinantes C-terminal FLAG-getagtes humanes ACC2 (Acetyl-Coenzym A Carboxylase 2, GenBank Accession No. NP_001084) (Aminosäuren 27 – Ende) verwendet, exprimiert in Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Hi5) und gereinigt durch Anti-FLAG-Affinitätschromatographie.

Für den Assay wurden 50 nl einer 100fach konzentrierten Lösung der Testsubstanz in DMSO in eine weiße low-volume 384well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

pipettiert, 2,5 µl einer Lösung von hACC2 in Assaypuffer [50 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 2 mM Kaliumcitrat, 12 mM NaHCO₃, 2 mM Di-thio-threitol (DTT), 0,005% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA)] hinzugegeben und die Mischung für 15 min inkubiert, um eine Vorbindung der Substanzen an das Enzym vor der Enzymreaktion zu ermöglichen. Dann wurde die

5 Enzymreaktion gestartet durch Zugabe von 2,5 µl einer Lösung von Adenosin-tri-phosphat (ATP, 100 µM =>Endkonzentration in 5 µl Assayvolumen ist 50 µM) und Acetyl-CoA (20 µM =>Endkonzentration in 5 µl Assayvolumen ist 10 µM) in Assaypuffer und die resultierende Mischung für die Reaktionszeit von 45 min bei 22°C inkubiert. Die Konzentration des hACC2 wurde an die jeweilige Aktivität des Enzyms angepasst und so eingestellt, dass der Assay im

10 linearen Bereich arbeitete. Typische Konzentrationen lagen im Bereich von 2 ng/µl. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2,5 µl des „ADP-GLO-Reagenz“ (1:1,5-fach verdünnt) und die resultierende Mischung 1 h bei 22°C inkubiert, um das nicht umgesetzte ATP vollständig in cAMP zu überführen. Anschließend wurden 2,5 µl des „Kinase Detection Reagenz“ (1,2fach konzentrierter als vom Hersteller angegeben) zugegeben, die resultierende Mischung 1 h bei 22°C

15 inkubiert und dann die Lumineszenz mit einem geeigneten Messgerät (Viewlux oder Topcount von Perkin-Elmer oder Pherastar von BMG Labtechnologies) gemessen. Die Menge des emittierten Lichtes wurde als Maß für die Menge des gebildeten ADP und damit für die Enzymaktivität der hACC2 genommen. Die Daten wurden normalisiert (Enzymreaktion ohne Inhibitor = 0 % Inhibition, alle anderen Assaykomponente aber kein Enzym = 100 % Inhibition). Üblicherweise

20 wurden die Testsubstanz auf derselben Mikrotiterplatten bei 10 verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 20 µM bis 1 nM (20 µM, 6.7 µM, 2.2 µM, 0.74 µM, 0.25 µM, 82 nM, 27 nM, 9.2 nM, 3.1 nM and 1 nM, die Verdünnungsreihen wurden vor dem Assay hergestellt auf der Ebene der 100fach konzentrierten Lösung durch serielle 1:3 Verdünnungen) in Doppelwerten für jede Konzentration getestet und IC₅₀-Werte wurden kalkuliert mit einem 4-Parameter-Fit, wofür eine

25 inhouse-Software verwendet wurde.

3.2 Zell-Assays

In Übereinstimmung mit der Erfindung, wurden die Substanzen in Zell-basierten Assays getestet,

30 das bedeutet die Fähigkeit der Substanzen die Tumorzellproliferation nach einer 96stündigen Substanzinkubation zu hemmen. Die Zellviabilität wurde mittels dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) getestet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2000-5000 Zellen/Well (abhängig von der Zelllinie) in 100µl Wachstumsmedium auf 96well Microtiterplatten ausgesät. Für jede untersuchte Zelllinie, wurden Zellen auf eine separate Platte zur Bestimmung

35 der Lumineszenz an t=0 Stunden und t=96 Stunden ausgesät. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C, wurden die Lumineszenzwerte für die t=0 Proben bestimmt. Die Dosis-Platten für die t=96 Stunden Zeitpunkte wurden mit in Wachstumsmedium verdünnten Substanzen behandelt. Die

- Zellen wurden dann für 96 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend die Lumineszenzwerte für die t=96-Stunden Proben bestimmt. Für die Datenanalyse wurden die t=0 Werte von den t=96 Stunden Werte abgezogen für behandelte und unbehandelte Proben. Die prozentualen Unterschiede in der Lumineszenz zwischen mit Substanz behandelten und Kontrollwerten wurden benutzt um die
- 5 prozentuale Wachstumshemmung zu bestimmen.

Die Substanzen wurden in folgenden Zelllinien untersucht, die beispielhaft die angegebenen Indikationen vertreten:

Zelllinie	Quelle	Indikation
MCF7	ATCC	Hormonrezeptor-positives Mammakarzinom
KM12	NCI	Kolorektales Karzinom
PC3	DMSZ	Androgenrezeptor-negatives Prostatakarzinom
H460	ATCC	Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom

10

ATCC: American Type Culture Collection

NCI: National Cancer Institute

DMSZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

15 3.3 Analyse der ACC1 Expression in Tumor- and Normalgewebe

- Die ACC1 Expression wurde mittels eines Microrrays bestimmt. Dafür wurde die RNA aus verschiedenen Tumorgeweben und den korrespondierenden Normalgeweben isoliert. Methodisch wurde Trizol RNA extraction Reagenz (Invitrogen) verwendet und eine Aufreinigung mittels des
- 20 RNeasy Mini Kit (Qiagen) angeschlossen. Ausserdem wurde ein DNase I (Qiagen) Verdau durchgeführt, um genomische DNA zu eliminieren. Zur Qualitätskontrolle wurde eine Analyse der totalen RNA mittels eines RNA LabChip auf einer Agilent Bioanalyzer 2100 Platform (Agilent Technologies) durchgeführt und die RNA Konzentration mittels des Peqlab NanoDrop Systems bestimmt. Zur Hybridisierung wurde der „one-cycle eukaryotic target labeling assay“ von
- 25 Affymetrix verwendet und der Array anschliessend auf einem AffymetrixGeneChip 3000 scanner (Affymetrix) ausgelesen. Auswertung und Qualitätskontrolle erfolgten unter Verwendung der Expressionist Pro 4.0 Refiner (GeneData) Software.

**3.4 Assays zur Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP/D)
der Membranaffinität (logMA) und
der Proteinbindung an humanes Serum Albumin (K_d HSA)**

5 Assay zur Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP/D):

Der Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser P bzw. D ist ein Schlüsselparameter zur Abschätzung von Membran-Penetration und Permeabilität. Er ist definiert als Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen einer Substanz im Zwei-Phasensystem Oktanol/Wasser.

10

$$P/D = \frac{C_{\text{Oktanol}}}{C_{\text{Wasser}}}$$

P = Partition (engl. Verteilung)

D = Distribution (engl. Verteilung)

15 cOktanol = Konzentration der Substanz in der Oktanol-Phase

cWasser = Konzentration der Substanz in der wässrigen Phase

Er wird üblicherweise in Form des dekadischen Logarithmus (logP bzw. logD) angegeben.

20 Der logP beschreibt das Verteilungsverhalten einer Substanz, die ausschließlich in ihrer neutralen Form vorliegt. Der logD beschreibt das Verteilungsverhalten einer Substanz bei einem bestimmten pH-Wert; in Abhängigkeit von der Ionisierungskonstante pK_a des Substanz, kann dabei ein Teil der Substanz in ionischer, ein Teil in neutraler Form vorliegen.

25 Der logP/D-Wert der Wirkstoffe wurde mit einer isokratischen HPLC-Methode (HPLC = High performance liquid chromatography) bestimmt (Literatur: OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 117). Die Methode basiert auf der Korrelation der HPLC-Retentionszeit der Testsubstanz mit der von Referenzsubstanzen mit bekannten Verteilungskoeffizienten.

30 Die Testsubstanz wurde als 10 mM-DMSO-Lösung (DMSO = Dimethylsulfoxid) eingesetzt. 10 µl dieser Lösung wurden mit einem Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 7 + 3 auf 100 µl aufgefüllt.

Die neun Referenzsubstanzen wurden einzeln in Methanol gelöst. Die Konzentration ist der
35 Tabelle 1 zu entnehmen. Es wurden je 100µl der Stammlösungen zusammen in ein HPLC-Vial gegeben und mit 300µl Wasser gemischt.

Tab. 1

Referenzsubstanz	Log P	Ungefähre Retentionszeit [min]	Molare Masse	Einwaage Stammlösg. [mg/10ml]
Acetanilid	1,0	0,8	135,2	12
4-Methylbenzylalkohol	1,6	0,9	122,2	15
Methylbenzoat	2,1	1,1	136,2	18
Ethylbenzoat	2,6	1,4	150,2	19
Naphthalin	3,6	2,1	128,2	3
1,2,4-Trichlorbenzol	4,2	3,4	181,5	14
2,6-Diphenylpyridin	4,9	4,6	231,3	5
Triphenylamin	5,7	8,0	245,3	8
DDT	6,2	10,3	354,5	10

Zur Bestimmung der Totzeit wurde eine Formamid-Lösung eingesetzt. Dazu wurden 7 mg Formamid in 10 ml Methanol gelöst. 100µl dieser Stammlösung wurden mit 500µl Methanol und
5 200µl Wasser gemischt.

Alle Lösungen wurden mit einem Fluss von 1.00ml/min chromatographiert.

Chromatographische Bedingungen:

10	HPLC-Anlage	Waters Alliance HT 2790
	UV-Detektor	DAD Waters 996
	MS-Detektor	MS Micromass ZQ
	HPLC Software	MassLynx 4.1 der Firma Waters
	Säule	Spherisorb ODS 3µm 4,6 x 60 mm
15	Laufmittel	Methanol + Wasser mit 0.01M Ammoniumacetat (0.77g/Liter) 75 + 25, pH 7.0
	Einspritzvolumina:	
	Formamid	5µl
	Referenzen	5µl
20	Testsubstanz	15µl

Injektionsschema:

Formamid, Referenzen, Testsubstanz 1, Testsubstanz 2, ..., Formamid, Referenzen.

Die Auswertung der Retentionszeiten erfolgte im Diodenarray-Detektor (DAD) bei 200-400nm. Mit dem nachgeschalteten Massenspektrometer wurde über die Molekülmasse die Identität der Testsubstanz überprüft.

- 5 Der HPLC-Lauf wurde mit der Waters-Software Masslynx 4.1 ausgewertet.
Die LogP/D Werte wurden mit der Software "POW Determination" (proprietäre Entwicklung) berechnet.

Assays zur Bestimmung der Membranaffinität logMA und der Proteinbindung an humanes
10 **Serum Albumin (HSA):**

- Die Bestimmung der Membranaffinität und der Proteinbindung an humanes Serum Albumin (HSA) erfolgte über die Transil-Technologie (Literatur: A. Loidl-Stahlhofen, A. Eckert, T. Hartmann, M. Schöttner J Pharm Sci 90, 599-606 (2001). Bei Transil® (vertrieben von der Firma
- 15 Sovicell in Leipzig) handelt es sich um Glaskügelchen (Durchmesser 10 - 12 µm), auf denen eine doppelschichtige Membran aus Phosphatidylcholin (MA-Transil) oder kovalent gebundenes humanes Serum Albumin (HSA-Transil) aufgebracht ist.

- Zur Bestimmung des logMA und der Proteinbindungskonstante an HSA wurde das kommerziell
- 20 verfügbare TRANSIL Intestinal Absorption & HSA Binding Combined Assay Kit verwendet. Dabei handelt es sich um eine 96 well Mikrotiterplatte (96 well-MTP), gefüllt mit Transil, mit der für jeweils acht Wirkstoffe die Bindung an MA-Transil und HSA-Transil bestimmt werden kann. Für jeden Wirkstoff steht eine Reihe mit 12 wells auf der Transil-Platte zur Verfügung. Zwei Wells dienen als Referenz und sind nur mit Puffer pH 7.4 befüllt. Fünf weitere Wells enthalten
- 25 MA-Transil in unterschiedlicher ansteigender Konzentration, die fünf restlichen wells enthalten HSA-Transil in unterschiedlicher ansteigender Konzentration.

- Um die Bindung eines Wirkstoffs an Transil zu ermitteln, wurde der Überstand der wells mit Transil gegen die Referenzlösung ohne Transil über HPLC-MS-Kopplung (HPLC-MS =
- 30 Highperformance liquid chromatography-mass spectrometry) quantifiziert.

Die Durchführung des Assays im Einzelnen:

- Vom internen Substanzlager wurden die Wirkstoffe in einer 96 well-MTP geliefert. Diese Platte wird als Mutterplatte bezeichnet. Pro well waren 30µl einer 10 mmol Wirkstofflösung in DMSO
- 35 (Dimethylsulfoxid) enthalten. Zwei wells am Anfang (well A1) und am Ende der Platte (well H12) wurden mit 30µl 10 mmol Warfarinlösung in DMSO befüllt. Warfarin, dessen Membranaffinität und Bindung an HSA bekannt ist, dient zur Überprüfung der Richtigkeit der Messung. Aus der

Mutterplatte wurde eine Tochterplatte mit der Verdünnung 1 zu 4000 mit einem Gemisch Puffer pH 7.4 und DMSO im Verhältnis 1+1 hergestellt. Die Wirkstoffkonzentration pro well betrug 2.5 µmol/Liter, das Volumen pro well betrug 400 µl.

5 Mit einem Hamilton-Pipettierroboter Microlab STAR wurden die 96 Wirkstoffe aus der Tochterplatte auf insgesamt 12 Transil-Platten verteilt. Pro well der Tochterplatte wurden 12 mal 20µl entnommen. Die Konzentration je well in der Transil-Platte betrug 0.25µmol/Liter, einer Verdünnung 1 zu 10 entsprechend. Der Gehalt an DMSO lag bei 5%.

10 Die befüllten Transil-Platten wurden je zwei Minuten resuspendiert, anschließend mindestens zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 600 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde vom Pipettierroboter 20 µl Überstand aus jedem Well der Transil-Platte abgenommen und in eine separate Mikrotiterplatte überführt. Dabei wurden jeweils die Überstände von vier Transil-Platten in einer Mikrotiterplatte vereinigt („gepoolt“), so dass am Ende drei gepoolte Mikrotiterplatten mit je 80µl Lösung und einer Wirkstoffkonzentration

15 von 62.5 nM pro Well vorlagen.

Bevor die Wirkstoffe mittels HPLC-MS quantifiziert werden können, muss für jeden Wirkstoff eine Optimierung durchgeführt werden, bei der durch einmalige Injektion Tochterion sowie optimale elektrische Spannungen ermittelt werden. Dazu fertigte der Pipettierroboter von der

20 Mutterplatte eine Verdünnung von 1 zu 10 000 000 in einem Acetonitril-Wasser Gemisch im Verhältnis 8 + 2 in einer separaten Mikrotiterplatte an.

Diese Mikrotiterplatte wurde mit der Software Discovery Quant Optimize der Firma AB Sciex an der HPLC-MS vermessen. Die drei gepoolten Mikrotiterplatten wurden mit der Software Discovery Quant Analyze der Firma AB Sciex an der HPLC-MS vermessen.

25

Chromatographische Bedingungen:

HPLC-MS-System:	Agilent 1200 Rapid resolution HPLC Sciex Triple Quad 5500 Massenspektrometer (Firma AB Sciex) PAL Autosampler DLW Option
30 Software:	Analyst 1.4 (Firma AB Sciex) Discovery Quant Optimize (Firma AB Sciex) Discovery Quant Analyze (Firma AB Sciex)

Optimierung:

Säule:	Kapillare
35 Injektionsvolumen:	5 µl
Flussrate:	0 min -> 80µl/min 0 – 0.19 min -> 80µl/min 0.20 – 0.65 min-> 30µl/min 0.66 – 0.7 min -> 150µl/min

Fließmittel: A = Acetonitril + 0.05% Ameisensäure
 B = Wasser + 0.05% Ameisensäure
 Isokratisch A:B 8 + 2

Analyse:

- 5 Säule: Poroshell 120 SB-C18 2.7µm 3 x 30 mm
 Injektionsvolumen: 2 µl
 Flussrate: 1ml/min
 Fließmittel: Gradient
 A = Acetonitril + 0.05% Ameisensäure
 10 B = Wasser + 0.05% Ameisensäure
 0 min -> 95% A, 5% B
 0 – 1.0 min -> 5%A, 95%B linear steigend
 1.0 – 2.2 min -> 5% A, 95%B isokratisch
 2.21 -2.3 min -> 95%A, 5% B isokratisch

15

3.5 Bestimmung der Plasmaproteinbindung durch Gleichgewichtsdialyse

- 20 Die Bestimmung der Bindung von Prüfsubstanzen an Plasmaproteine erfolgt durch Gleichgewichtsdialyse mit Hilfe der Ht-Dialysis Apparatur (96well) aus Teflon und einer semipermeablen Membran (regenerierte Cellulose, MWCO 12-14K). Diese trennt je 150 µl einer Plasma- und einer Pufferseite (50 mM Phosphatpuffer). Die Prüfsubstanz wird in 2 Konzentrationen (üblicherweise 3 und 0.3 µM) zur Plasmaseite hinzugefügt und bindet an
- 25 Plasmaproteine. Der ungebundene Anteil der Prüfsubstanz passiert die Membran passieren und verteilt sich auf beide Seiten bis ein Gleichgewicht eingestellt ist (ca. nach 6-8h bei 37°C). Die Substanzkonzentration auf Puffer- und Plasmaseite durch LC-MS-Analytik ermittelt. Dafür werden beide Seiten durch Verdünnung mit Puffer oder Plasma auf die gleiche Matrix (10% Plasma) gebracht und anschließend mit Methanol gefällt. Aus dem Quotienten der Puffer- und Plasma-
- 30 konzentration berechnet sich die freie (ungebundene) Fraktion (fu). Als Kontrollen werden Stabilitätsproben, Wiederfindungsproben mitgeführt. Zusätzlich wird die Substanz in Puffer gegen Puffer dialysiert, um die unspezifische Bindung an Apparatur und Membran und die Einstellung des Gleichgewichtes zu überprüfen. Da es während der Inkubation durch den osmotischen Druck der Plasmaproteine zu einer Verdünnung des Plasmas kommt (Volumenshift), wird dieser
- 35 mögliche Fehler durch Auswiegen von Leerplasmaproben ermittelt und in die Berechnung der fu einbezogen. Die Gleichgewichtseinstellung und Plasmastabilität sollte einen Wert von 80% nicht unterschreiten und die Recovery mindestens 30% betragen. Eine freie Fraktion von <1% wird als hohe, zwischen 1 und 10% als moderate und von >10% als niedrige Plasmaproteinbindung bezeichnet.

40

3.6 Pharmakokinetische Parameter

Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter einer Prüfsubstanz in der Ratte und im Hund

5

Hierzu wurden die Prüfsubstanzen sowohl für die intravenöse als auch für die intragastrale Applikation in gelöster Form appliziert, wobei verträgliche Lösungsvermittler wie PEG400 und/oder Ethanol in verträglicher Menge verwendet wurden.

10 Intravenöse Applikation:

Die Prüfsubstanzen wurden bei einer Dosis von 0.1 -1 mg/kg appliziert. Die Applikation erfolgte in der männlichen Ratte als bolus Injektion, im weiblichen Hund als Infusion (15 Min). Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach bolus Injektion bzw, vor und nach der 15-minütiger

15

Infusion ca. 100-150µL Blutproben über einen Katheter aus der Vena jugularis (Ratte) oder aus der vena saphena (Hund) entnommen. Die Blutproben wurden mit Lithium-Heparin als Antikoagulanzen versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung gekühlt aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 15min bei 3000Upm wurde ein Aliquot von 100µL dem Überstand (Plasma) entnommen und durch Zugabe von 400µL kaltem ACN oder Methanol (absolut) gefällt.

20

Die gefällten Proben wurden über Nacht bei 20°C ausgefroren, danach wiederum für 15min bei 3000 UpM zentrifugiert, bevor 150µL des klaren Überstandes zur Konzentrationsbestimmung abgenommen wurde. Die Analytik erfolgte durch ein Agilent 1200 HPLC-System mit angeschlossener LCMS/MS Detektion.

25

Berechnung der PK Parameter (via PK Berechnungssoftware, z.B. WinNonLin®): CLplasma: Gesamtplasma-Clearance der Prüfsubstanz (in L*kg/h); CLblood: Gesamtblut-Clearance der Prüfsubstanz (in L*kg/h), wobei (CLblood = CLplasma*Cp/Cb); Vss: Apparentes Verteilungsvolumen im steady state (in L/kg); t1/2: Halbwertszeit innerhalb eines spezifizierten Intervalls (hier: terminale t1/2, in h); AUCnorm: Fläche unter dem Plasmakonzentrationszeitprofil vom Zeitpunkt Null bis zur Unendlichkeit extrapoliert geteilt durch die

30

körpergewichtsnormalisierte Dosis (in kg*L/h); AUC(0-tn)norm: Integrierte Fläche unter dem Plasmakonzentrationszeitprofil vom Zeitpunkt Null bis zum letzten Zeitpunkt, zu dem eine Plasmakonzentration messbar war, geteilt durch die körpergewichtsnormalisierte Dosis (in kg*L/h); Cmax: Maximale Konzentration der Prüfsubstanz im Plasma (in µg/L); Cmax,norm:

35

Maximale Konzentration der Prüfsubstanz im Plasma geteilt durch die körpergewichtsnormalisierte Dosis (in kg/L); Cb/Cp: Verhältnis der Blut zu Plasma Konzentrationsverteilung.

Intragastrale Applikation:

Die Prüfsubstanzen wurden bei einer Dosis von 0.3 -1 mg/kg mittels einer Sonde intragastral als Bolus an nüchterne männliche Ratten oder weibliche Hunde appliziert. Zu verschiedenen
5 Zeitpunkten nach Applikation wurden ca. 100 - 150µL Blutproben über einen Katheter aus der Vena jugularis (Ratte) oder aus der Vena saphena (Hund) entnommen. Die Blutproben wurden mit Lithium-Heparin als Antikoagulanzen versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung gekühlt aufbewahrt (Kühlschrank). Nach dem Zentrifugieren der Proben für 15min bei 3000Upm wurde ein Aliquot von 100µL dem Überstand (Plasma) entnommen und durch Zugabe von 400µL kaltem ACN oder
10 Methanol (absolut) gefällt. Die gefällten Proben wurden über Nacht bei -20°C ausgefroren, danach für 15min bei 3000UpM zentrifugiert bevor 150µL des klaren Überstandes zur Konzentrationsbestimmung abgenommen wurde. Die Analytik erfolgte durch ein Agilent 1200 HPLC-System mit angeschlossener LCMS/MS Detektion

15 Berechnung der PK Parameter (via PK Berechnungssoftware, z.B. WinNonLin®):

AUCnorm: Fläche unter dem Plasmakonzentrationszeitprofil vom Zeitpunkt Null bis zur Unendlichkeit extrapoliert geteilt durch die körpertgewichtsnormalisierte Dosis (in kg*L/h);
AUC(0-tn)norm: Integrierte Fläche unter dem Plasmakonzentrationszeitprofil vom Zeitpunkt Null bis zum letzten Zeitpunkt, zu dem eine Plasmakonzentration messbar war, geteilt durch die
20 körpertgewichtsnormalisierte Dosis (in kg*L/h); Cmax: Maximale Konzentration der Prüfsubstanz im Plasma (in µg/L); Cmax,norm: Maximale Konzentration der Prüfsubstanz im Plasma geteilt durch die körpertgewichtsnormalisierte Dosis (in kg/L); t1/2: Halbwertszeit innerhalb eines spezifizierten Intervalls (hier: terminale t1/2, in h); Fobs%: beobachtete orale Bioverfügbarkeit, AUC(0-tn)norm nach i.g. Gabe geteilt durch AUC(0-tn)norm nach i.v. Gabe. tmax: Zeitpunkt,
25 zudem die maximale Konzentration der Prüfsubstanz im Plasma gemessen wird.

Zur Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit einer Testsubstanz wird die AUC(0-tn)norm nach i.g. Gabe einer mikrokristallinen Substanz-Suspension geteilt durch die AUC(0-tn)norm nach Gabe einer Substanz-Lösung.

3.7. in-vivo-Wirksamkeit

Xenograft Modell

- 5 Zur Bestimmung der antitumoralen Wirksamkeit im lebenden Organismus wurden Xenograft-Modelle in immunsupprimierten Mäusen verwendet.

Zunächst wurde hierzu die maximal tolerierbare Dosis (MTD) nach folgendem Protokoll ermittelt: Weibliche Nacktmäuse (NMRI-nude (nu/nu) mice, Taconic M&B A/S) erhielten über einen

- 10 Zeitraum von 3 Wochen täglich oral eine definierte Dosis der Testsubstanz und wurden täglich bezüglich Sterblichkeit und Körpergewicht beobachtet. Als MTD definiert wurde die höchste verabreichbare Dosis, bei der während der Behandlungsphase kein Tier starb und es nicht zu einem mehr als 10% Abfall des Körpergewichts im Vergleich zum Ausgangsgewicht kam.

- 15 Zur Bestimmung der antitumoralen Wirksamkeit wurden dann Xenograftmodelle verwendet, in denen die Testsubstanzen an ihrer MTD oder, falls diese zuvor nicht zu ermitteln war, an der im Standard-Vehikel höchsten formulierbaren Dosis sowie zum Teil auch in niedrigeren Dosierungen gegeben wurden. Es wurde primär ein Prostatakarzinommodell mit hormon-unabhängigen humanen PC-3 Zellen in männlichen Nacktmäusen (NMRI-nude (nu/nu) mice, Taconic M&B A/S)
- 20 verwendet. Hierfür wurden pro Tier 3 Mio Tumorzellen (suspendiert in Medium + Matrigel) 1:1, final 0,1 ml) in die Flanke subcutan injiziert. Wenn die Tumore 20-30 mm² Tumorfläche erreicht hatten, wurden die Mäuse in die Therapiegruppen randomisiert und mit der Therapie begonnen. Die Therapie wurde dann unter 2-3-mal wöchentlicher Messung von Tumorfläche und Körpergewicht fortgesetzt, bis die durchschnittliche Tumorgroße in der Kontrollgruppe, die nur
- 25 den Vehikel der Testsubstanz erhalten hatte, oder in einer der Behandlungsgruppen 130-160 mm² erreicht hatte. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Versuch in allen Gruppen abgebrochen und die präparierten Tumore gewogen.

- Als primärer Erfolgsparameter wurde der T/C-Wert kalkuliert anhand des Effektes auf das finale Tumorgewicht errechnet: Mittelwert der Tumorgewichte in der Behandlungsgruppe dividiert durch
- 30 den Mittelwert der Tumorgewichte in der Vehikelgruppe.

4. Ergebnisse:**4.1. Enzymassay**

- 5 Die Tabelle 2 fasst die Ergebnisse in Bezug auf die Ausführungs- und Vergleichsbeispiele aus den Enzymassays zusammen. Für die genaue Bestimmung der Selektivität wurden jeweils die Messungen der Inhibition von ACC1 und ACC2 (jeweils IC50-Bestimmungen) paarweise miteinander verglichen, bei denen in beiden Assays Kopien derselben Substanzverdünnungsreihe verwendet wurden. Wenn entweder die die ACC1- oder die ACC2-IC50-Bestimmung aufgrund
- 10 mangelnder Datenqualität nicht ausgewertet wurde, blieben jeweils beide Messungen unberücksichtigt und wurden nicht in der Tabelle aufgeführt. Die Selektivität der Hemmung von ACC1 gegenüber der Hemmung von ACC2 wurde dann bestimmt als Mittelwert der in den einzelnen Messungen beobachteten Selektivitäten.

15 Tab. 2

Beispiel	Messung Nr.	Präparation Nr.	ACC 1 IC50 [μmol/l]	ACC 2 IC50 [μmol/l]	Verhältnis IC50s ACC2/ACC1 (jeweilige Messung)	Selektivität ACC1 vs. ACC2 (Mittelwert der einzelnen Messungen ± Standardabweichung)
1-1	1	1	0.231	11.5	50	49 ± 27
	2	1	0.244	13.5	55	
	3	2	0.044	3.31	75	
	4	2	0.067	4.15	62	
	5	3	0.087	6.46	74	
	6	3	0.078	7.42	95	
	7	1	0.162	3.39	21	
	8	1	0.186	4.50	24	
	9	4	0.099	0.98	10	
	10	4	0.069	1.57	23	
V.1-a	1	1	0.108	3.13	29	28.2 ± 8.5
	2	1	0.182	3.93	22	
	3	2	0.132	4.54	34	
	4	3	0.097	2.53	26	
	5	4	0.055	2.33	42	
	6	3	0.104	2.51	24	
	7	4	0.213	3.36	16	
	8	5	0.137	2.75	20	
	9	5	0.151	2.03	13	
	10	6	0.081	2.86	35	
	11	6	0.091	3.32	36	
	12	7	0.147	5.14	35	
	13	7	0.158	5.20	33	
V.1-b	1	1	0.109	1.22	11.2	9.8 ± 1.4
	2	1	0.111	0.94	8.4	
1-2	1	1	0.092	2.76	29.9	21.6 ± 5.9
	2	1	0.094	1.69	18.1	
	3	1	0.119	2.01	16.9	

Beispiel	Messung Nr.	Präparation Nr.	ACC 1 IC50 [μmol/l]	ACC 2 IC50 [μmol/l]	Verhältnis IC50s ACC2/ACC1 (jeweilige Messung)	Selektivität ACC1 vs. ACC2 (Mittelwert der einzelnen Messungen ± Standardabweichung)
V.2-a	1	1	0.083	9.56	114.8	57.2 ± 26.4
	2	2	0.249	9.20	37.0	
	3	3	0.063	4.99	79.1	
	4	3	0.067	5.80	87.1	
	5	4	0.154	8.63	55.9	
	6	4	0.184	7.81	42.4	
	7	5	0.184	8.81	48.0	
	8	6	0.090	3.99	44.5	
	9	4	0.087	2.14	24.8	
	10	4	0.075	2.90	38.5	
V.2-b	1	1	0.067	0.580	8.6	9.4 ± 0.8
	2	1	0.059	0.610	10.3	
1-3	1	1	0.165	8.08	49.0	47.0 ± 2.1
	2	1	0.146	6.55	44.9	
V.3-a	1	1	0.108	3.13	28.9	28.2 ± 8.5
	2	1	0.182	3.93	21.6	
	3	2	0.132	4.54	34.4	
	4	3	0.097	2.53	26.1	
	5	4	0.055	2.33	42.3	
	6	3	0.104	2.51	24.2	
	7	4	0.213	3.36	15.7	
	8	5	0.137	2.75	20.1	
	9	5	0.151	2.03	13.4	
	10	6	0.081	2.86	35.2	
	11	6	0.091	3.32	36.5	
	12	7	0.147	5.14	35.1	
	13	7	0.158	5.20	33.0	
V.3-b	1	1	0.092	0.591	6.4	6.4
1-4	1	1	0.104	4.35	41.7	30.8 ± 8.5
	2	1	0.133	4.06	30.6	
	3	2	0.131	3.05	23.3	
	4	2	0.116	3.82	33.1	
	5	3	0.084	3.30	39.0	
	6	3	0.123	2.12	17.2	
V.4-a	1	1	0.083	9.56	114.8	57.2 ± 26.4
	2	2	0.249	9.20	37.0	
	3	3	0.063	4.99	79.1	
	4	3	0.067	5.80	87.1	
	5	4	0.154	8.63	55.9	
	6	4	0.184	7.81	42.4	
	7	5	0.184	8.81	48.0	
	8	6	0.090	3.99	44.5	
	9	4	0.087	2.14	24.8	
	10	4	0.075	2.90	38.5	
V.4-b	1	1	0.073	1.118	15.2	15.2

Diese Daten zeigen, dass die Verbindungen ohne trans-Methoxy-gruppe eine deutlich schlechtere Selektivität gegen humanes ACC2 besitzen. Einige verwandte Strukturen des Standes der Technik mit trans-Methoxy-Gruppe in Position 8 des Azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on-Ringsystems inhibieren ACC1 auch stark und sind selektiv gegen ACC2. Diese Eigenschaft der Strukturen des Standes der Technik war unbekannt, nicht nahegelegt und nicht ohne unzumutbaren Aufwand auffindbar.

4.2 Zell-Assays

Die Tabelle 3 fasst die Ergebnisse in Bezug auf die Ausführungs- und Vergleichsbeispiele aus den Cellassays zusammen.

Tab. 3

Beispiel	KM12 IC50 ($\mu\text{mol/L}$)	PC3 IC50 ($\mu\text{mol/L}$)	H460 IC50 ($\mu\text{mol/L}$)	MCF7 IC50 ($\mu\text{mol/L}$)
1-1	0.021	0.029	0.088	0.026
V.1-a	0.038	0.035	0.079	0.023
V.1-b	0.037	0.038	0.057	0.035
V.1-c	0.827	0.275	1.870	0.288
1-2	0.014	0.022	0.104	<0.014
V.2-a	0.073	0.046	0.082	0.032
V.2-b	0.245	0.398	0.573	0.030
V.2-c	2.370	0.767	2.120	0.309
1-3	0.222	0.194	0.365	0.045
V.3-a	0.038	0.035	0.079	0.023
V.3-b	0.031	0.036	0.067	0.023
1-4	0.096	0.120	0.333	0.048
V.4-a	0.073	0.046	0.082	0.032
V.4-b	0.035	0.030	0.043	0.020

4.3 ACC1 Expression in Tumor- und Normalgewebe

Die ACC1 Expression in Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe wurde mittels Microarray bestimmt (Figur 1). Die Expression von ACC1 war signifikant hochreguliert im Vergleich zum Normalgewebe in Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Bronchialkarzinomen und Pankreaskarzinomen.

4.4 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP/D), Membranaffinität (logMA) und Proteinbindung an humanes Serum Albumin (K_d HSA)

Tabelle 4 zeigt die ermittelten logP/D, logMA und K_d HSA-Werte.

5

Die Auswertung der HPLC-Peaks erfolgte über Discovery Quant Analyze. Die Berechnung der Ergebnisse (logMA bzw. Bindungskonstante an HSA K_d) erfolgte über ein von der Firma Sovicell bereitgestelltes Excelworkbook.

10 Tab. 4

Beispiel	logP/D pH7.4	logMA	K_d HSA [μ mol/l]
1-1	2.44 (2.4-2.5, n=5)	1.78 (1.6-1.9, n=5)	1.73 (1.32-2.16, n=5)
V.1-a	2.51 (2.4-2.6, n=7)	1.4 (0.9-1.7, n=7)	4.84 (3.66-6.18, n=7)
V.1-b	2.23 (1.8-2.5, n=3)	2.38 (2.0-2.7, n=4)	3.07 (2.38-2.8, n=3)
V.1-c	1.6 (n=1)	2.1 (n=1)	6.9 (n=1)
1-2	2.45 (2.4-2.5, n=2)	1.8 (n=1)	1.79 (n=1)
V.2-a	2.52 (2.5-2.6, n=8)	1.67 (1.2-1.9, n=6)	2.8 (2.42-3.67, n=6)
V.2-b	2.55 (2.4-2.7, n=2)	2.55 (2.4-2.7, n=2)	1.43 (1.16-1.7, n=2)
V.2-c	1.3 (n=1)	2.3 (n=1)	1.38 (n=1)
1-3	2.3 (n=1)	<1.0 (n=1)	4.8 (n=1)
V.3-a	2.51 (2.4-2.6, n=7)	1.4 (0.9-1.7, n=7)	4.84 (3.66-6.18, n=7)
V.3-b	2.5 (2.5, n=4)	2.08 (1.9-2.3, n=4)	4.2 (3.41-4.89, n=4)
1-4	2.38 (2.3-2.4, n=5)	1.14 (0.9-1.3, n=5)	2.85 (1.96-3.4, n=5)
V.4-a	2.52 (2.5-2.6, n=8)	1.67 (1.2-1.9, n=6)	2.8 (2.42-3.67, n=6)
V.4-b	2.57 (2.5-2.6, n=3)	2.13 (2.1-2.2, n=3)	3.64 (2.48-5.18, n=3)

4.5 Plasmaproteinbindung durch Gleichgewichtsdialyse

Tabelle 5 zeigt die durch Gleichgewichtsanalyse ermittelte Bindung an Plasmaproteine des Menschen, der Maus und der Ratte.

5

Tab.5

Beispiel	fu [%] (human)	fu [%] (Maus)	fu [%] (Ratte)	fu (Maus) / fu (human)
1-1	0.2 (0.18-0.23, n=2)	0.82 (0.75-0.88, n=2)	-	4
V.1-a	0.38 (0.33-0.44, n=2)	2.49 (2.35-2.62, n=2)	0.23 (n=1)	7
V.1-b	0.07 (n=1)	2.41 (n=1)	-	34
V.1-c	-	-	-	-
1-2	0.26 (n=1)	1.4 (1.29-1.51, n=2)	-	5
V.2-a	0.39 (n=1)	2.8 (n=1)	0.23 (0.22-0.25, n=2)	7
V.2-b	0.05 (n=1)	1.9 (n=1)	-	39
V.2-c	-	-	-	-
1-3	0.41 (0.40-0.42, n=2)	3.8 (3.57-4.02, n=2)	-	9
V.3-a	0.38 (0.33-0.44, n=2)	2.49 (2.35-2.62, n=2)	0.23 (n=1)	7
V.3-b	0.36 (0.35-0.38, n=2)	10.87 (10.4-11.3, n=2)	7.79 7.25-8.33 (n=2)	30
1-4	0.37 (0.37-0.38, n=2)	2.17 (2.06-2.28, n=2)	0.21 (n=2)	6
V.4-a	0.39 (n=1)	2.8 (n=1)	0.23 (0.22-0.25, n=2)	7
V.4-b	1.41 (n=1)	1.76 (n=1)	0.11 (n=1)	1

4.6 Pharmakokinetische Parameter

Pharmakokinetische Parameter aus der Ratte.

5 Tabelle 6 zeigt die pharmakokinetischen Parameter aus der Ratte.

Tab. 6

Beispiel	CL _{Plasma} [L/h/kg]	CL _{Blut} [L/h/kg]	t _{1/2} [h]	V _{ss} [L/kg]	F [%]
1-1	0.006	0.011	103	0.85	163
V.1-a	0.009	-	28	0.3	83
V.1-b	-	-	-	-	-
V.1-c	-	-	-	-	-
1-2	0.029	0.039	65	2.4	131
V.2-a	0.013	-	33	0.51	71
V.2-b	-	-	-	-	-
V.2-c	-	-	-	-	-
1-3	0.002	0.005	79	0.29	68
V.3-a	0.009	-	28	0.3	83
V.3-b	-	-	-	-	-
1-4	0.007	0.011	51	0.44	83
V.4-a	0.013	-	33	0.51	71
V.4-b	-	-	-	-	-

10 4.7 in-vivo-Wirksamkeit

Maximal tolerierbare Dosis (MTD) in der Maus

Die Beispiele 1-1, V.1-a/V.3-a, V.2-a/V.4-a und 1-4 wurden weiblichen Nacktmäusen (NMRI
15 nu/nu) appliziert:

Dosis: s. Tab. 7

Applikationsart: per os

Vehikel: PEG400/Ethanol/Solutol HS 15(70/5/25, v/v/v)
(Solutol HS15: Polyoxyethylenester der 12-Hydroxystearinsäure)

20 Applikationsvolumen: 10ml/kg

Schema: s. Tab. 7

Der Behandlungsphase folgte eine Beobachtungsphase von 21 Tagen. Die dabei aufgetretenen Todesfälle sowie die Wirkung auf das Körpergewicht sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7

Substanz	Dosis (mg/kg)	Schema	Maximale Körpergewichtsveränderung (%)	Todesfälle
1-1	12,5	21 Tage, 1mal täglich	plus 12	0 von 4
1-1	25	21 Tage, 1mal täglich	plus 11	0 von 4
1-1	50	21 Tage, 1mal täglich	plus 10	1 von 4
1-1	75	21 Tage, 1mal täglich	plus 11	0 von 4
1-1	100	21 Tage, 1mal täglich	plus 16	0 von 4
V.1-a/V.3-a	25	21 Tage, 1mal täglich	plus 7	0 von 4
V.1-a/V.3-a	50	21 Tage, 1mal täglich	plus 17	0 von 4
V.1-a/V.3-a	100	21 Tage, 1mal täglich	plus 23	0 von 4
V.2-a/V.4-a	10	21 Tage, 1mal täglich	plus 21	0 von 4
V.2-a/V.4-a	20	21 Tage, 1mal täglich	plus 19	0 von 4
V.2-a/V.4-a	40	21 Tage, 1mal täglich	plus 17	0 von 4
V.2-a/V.4-a	80	21 Tage, 1mal täglich	minus 4	0 von 4
1-4	25	21 Tage, 2mal täglich	plus 9	0 von 4
1-4	50	21 Tage, 2mal täglich	plus 8	0 von 4
1-4	75	21 Tage, 2mal täglich	plus 0	0 von 4
1-4	100	21 Tage, 2mal täglich	plus 9	0 von 4
1-4	100	21 Tage, 1mal täglich	plus 13	0 von 4

5

Demzufolge liegt die MTD für eine 21tägige Behandlung bei 1mal täglicher Gabe für die Beispiele

1-1: oberhalb von 100 mg/kg

V.1-a/V.3-a: oberhalb von 100 mg/kg

V.2-a/V.4-a: oberhalb von 80 mg/kg

10 1-4: oberhalb von 100 mg/kg

Demzufolge liegt die MTD für eine 21tägige Behandlung bei 2mal täglicher Gabe von Beispiel 1-4 oberhalb von 100 mg/kg.

15 In vivo Wirksamkeit im PC3-Xenograft-Modell in der Maus

Die Beispiele 1-1, V.1-a/V.3-a, 1-2, V.2-a/V.4-a und 1-4 wurden nachfolgend im PC-3 Prostatakarzinom-Xenograft-Modell männlichen Nacktmäusen (NMRI nu/nu) appliziert:

Dosis: s. Tab. 8

- Applikationsart: per os
 Vehikel: PEG400/Ethanol/Solutol HS 15 (70/5/25, v/v/v)
 Applikationsvolumen: 10ml/kg
 Schema: s. Tab. 8
 5 Anzahl der Mäuse: s. Tab. 8

Tab. 8

Substanz	Dosis (mg/kg)	Schema	T/C	Maximale Körpergewichtsveränderung (%)	Todesfälle
1-1	80	15 Tage, 2mal täglich	0,34	minus 5	0 von 10
V.1-a/V.3-a	100	14 Tage, 1mal täglich	0,30	minus 8	0 von 9
V.1-a/V.3-a	100	14 Tage, 2mal täglich	0,15	minus 10	2 von 9
1-2	40	17 Tage, 2mal täglich	0,44	plus 0	0 von 9
1-2	80	17 Tage, 2mal täglich	0,28	minus 4	0 von 9
V.2-a/V.4-a	40	20 Tage, 1mal täglich	0,71	plus 5	0 von 9
V.2-a/V.4-a	80	20 Tage, 1mal täglich	0,44	plus 9	0 von 9
V.2-a/V.4-a	80	14 Tage, 2mal täglich	0,27	minus 17	1 von 9
1-4	80	17 Tage, 2mal täglich	0,29	minus 1	0 von 10

- Therapeutische Wirksamkeit wurde definiert als T/C-Wert von $\leq 0,50$. Gute Verträglichkeit
 10 wurde definiert als maximale Körpergewichtsveränderung von $\leq$ minus 10% und 100%
 Überleben der Versuchstiere.
 Demzufolge zeigte Beispiel 1-1 bei 80 mg/kg und 2mal täglicher Gabe therapeutische Wirksamkeit
 und gute Verträglichkeit.
 Demzufolge zeigte Beispiel V.1-a/V.3-a bei 100 mg/kg und 1mal täglicher Gabe therapeutische
 15 Wirksamkeit und gute Verträglichkeit, währenddessen 100 mg/kg und 2mal tägliche Gabe
 therapeutische Wirksamkeit aber keine gute Verträglichkeit zeigte.
 Demzufolge zeigte Beispiel 1-2 bei 40 mg/kg und 80 mg/kg (jeweils 2mal täglicher Gabe)
 therapeutische Wirksamkeit und gute Verträglichkeit.
 Demzufolge zeigte Beispiel V.2-a/V.4-a bei 80 mg/kg und 1mal täglicher Gabe therapeutische
 20 Wirksamkeit und gute Verträglichkeit, währenddessen 40 mg/kg und 1mal tägliche Gabe keine
 therapeutische Wirksamkeit und 80 mg/kg und 2mal tägliche Gabe keine gute Verträglichkeit
 zeigten.
 Demzufolge zeigte Beispiel 1-4 bei 80 mg/kg und 2mal täglicher Gabe therapeutische Wirksamkeit
 und gute Verträglichkeit.

Vorhersage humaner pharmakokinetischer Parameter und humaner therapeutischer Dosis

Die Vorhersage der humanen pharmakokinetischen (PK) Parameter (Tabelle 9) erfolgte auf Basis der *in vivo* PK Parameter, die für die Ratte erhoben wurden (single species scaling) unter Berücksichtigung von Spezies-Unterschieden in der freien Fraktion (*fu*) im Plasma. Die wirksame AUC (area under curve) wurde basierend auf dem gemessenen Plasma Konzentrationszeitprofil bei *in vivo* Wirksamkeit im PC3-Tumormodell der Maus (nu/nu Maus) bestimmt. Die Ermittlung der therapeutischen Humandosis erfolgte mittels vorhergesagter humaner Clearance (CL), der Annahme einer 100%igen Bioverfügbarkeit (*F*=1) und der wirksamen AUC im Tiermodell nach folgender Formel:

$$Dosis = AUC \times \frac{fu_{mouse}}{fu_{human}} \times \frac{CL}{F}$$

Tab. 9

Bsp.	Dosis (Maus) [mg/kg]	ther. AUC (Maus) [mg*h/L]	<i>fu</i> (Maus/ human)	ber. AUC (human) [mg*h/L]	vorh. CL (human) [L/h/kg]	vorh. Dosis (human) [mg/kg]	vorh. Dosis (human) [mg/Patient]
1-1	80 [2 x tägl]	289	4	1155	0.002	1.7	121
V.1-a	100 [1 x tägl]	984	6.6	6494	0.003	19.5	1365
	100 [2 x tägl]	1495		9867		30	2072
V.1-b	-	-	-	-	-	-	-
V.1-c	-	-	-	-	-	-	-
1-2	40 [2 x tägl]	66	5.4	355	0.009	3.2	223
	80 [2 x tägl]	156		842		7.6	531
V.2-a	80 [1x tägl]	544	7	3737	0.006	24	1674
	80 [2 x tägl]	672		4702		30	2106
V.2-b	-	-	-	-	-	-	-
V.2-c	-	-	-	-	-	-	-
1-3	-	-	-	-	-	-	-
V.3-a	100 [1 x tägl]	984	6.6	6494	0.003	19.5	1365
	100 [2 x tägl]	1495		9867		30	2072
V.3-b	-	-	-	-	-	-	-
1-4	80 [2 x tägl]	712	5.8	4127	0.003	12.4	867
V.4-a	80 [1x tägl]	544	7	3737	0.006	24	1674
	80 [2 x tägl]	672		4702		30	2106
V.4-b	-	-	-	-	-	-	-

15 ther. = therapeutisch

ber. = berechnet

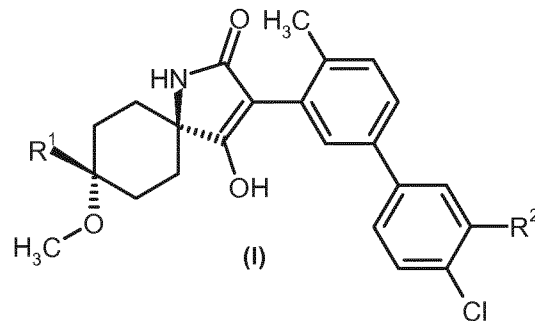
vorh. = vorhergesagt (*fu*-korrigiert)

Figuren:

Fig. 1: ACC1 Expression in Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe

Patentansprüche

1. Verbindungen gemäß Formel (I)



5

in der

R^1 für eine Trifluormethyl- oder Methoxymethylgruppe und

R^2 für Wasserstoff oder Fluor steht,

sowie deren Salze.

10

2. Verbindungen

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(methoxymethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

15

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-3'-fluor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

- (5r,8r)-3-(4'-Chlor-4-methylbiphenyl-3-yl)-4-hydroxy-8-methoxy-8-(trifluormethyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-on

20

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Verwendung als Arzneimittel.

4. Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.

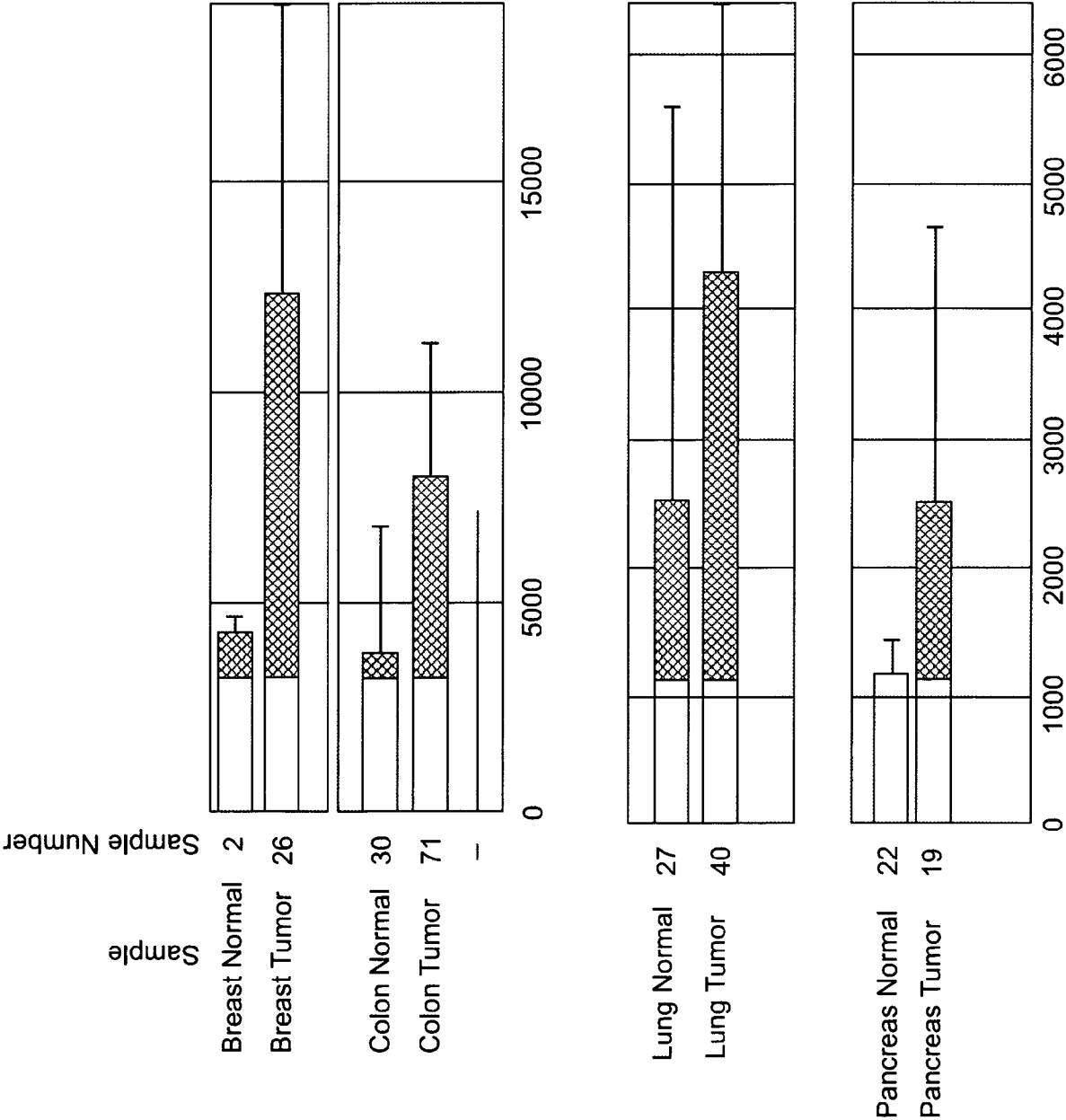
25

5. Verbindung gemäß Anspruch 4 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

30

6. Verbindung gemäß Anspruch 5 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen oder Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen.

7. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikamentes
8. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 7 zur Herstellung eines Medikamentes zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.
9. Verwendung gemäß Anspruch 8 zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.
10. Verwendung gemäß Anspruch 9 zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe und/oder Therapie von Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen oder Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen.
11. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen des Menschen oder eines anderen Säugetiers.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen.
13. Verwendung gemäß Anspruch 12 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Mammakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen oder Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen.
14. Verwendung gemäß Anspruch 13 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen oder Androgenrezeptor-negativen Prostatakarzinomen.
15. Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1 in Kombination mit einem weiteren Wirkstoff.
16. Pharmazeutische Formulierung enthaltend eine Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D209/54 A61K31/403 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTHEW P BOURBEAU ET AL: "Chapter 6 Recent Advances in Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", ANNUAL REPORTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, SAN DIEGO, US, vol. 45, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 95-108, XP008149459, ISSN: 0065-7743, DOI: 10.1016/S0065-7743(10)45006-X [retrieved on 2010-10-13] the whole document	1-16
A	----- WO 2010/063378 A1 (BAYER CROPSCIENCE AG [DE]; FISCHER REINER [DE]; LEHR STEFAN [DE]; DITT) 10 June 2010 (2010-06-10) cited in the application the whole document ----- -/-	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 August 2012

Date of mailing of the international search report

21/08/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Skulj, Primoz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/064974

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JEAN WENGER ET AL: "Chapter 9. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", 23 February 2007 (2007-02-23), MODERN CROP PROTECTION COMPOUNDS, WILEY.VCH, USA, PAGE(S) 335 - 357, XP008149458, ISBN: 978-3-527-31496-6 [retrieved on 2008-02-05] the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/064974

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010063378	A1	10-06-2010	
		AU 2009321813 A1	23-06-2011
		CA 2745006 A1	10-06-2010
		CN 102239145 A	09-11-2011
		CO 6361850 A2	20-01-2012
		CU 20110124 A7	31-01-2012
		DO P2011000162 A	30-06-2011
		EC SP11011092 A	30-06-2011
		EP 2373619 A1	12-10-2011
		JP 2012510482 A	10-05-2012
		KR 20110095912 A	25-08-2011
		MA 32835 B1	01-11-2011
		SG 171827 A1	28-07-2011
		US 2010261608 A1	14-10-2010
		WO 2010063378 A1	10-06-2010

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C07D209/54 A61K31/403 A61P35/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07D A61K A61P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MATTHEW P BOURBEAU ET AL: "Chapter 6 Recent Advances in Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", ANNUAL REPORTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, SAN DIEGO, US, Bd. 45, 1. Januar 2010 (2010-01-01), Seiten 95-108, XP008149459, ISSN: 0065-7743, DOI: 10.1016/S0065-7743(10)45006-X [gefunden am 2010-10-13] das ganze Dokument	1-16
A	WO 2010/063378 A1 (BAYER CROPSCIENCE AG [DE]; FISCHER REINER [DE]; LEHR STEFAN [DE]; DITT) 10. Juni 2010 (2010-06-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/-	1-16
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 15. August 2012		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 21/08/2012
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Skulj, Primoz

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JEAN WENGER ET AL: "Chapter 9. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", 23. Februar 2007 (2007-02-23), MODERN CROP PROTECTION COMPOUNDS, WILEY.VCH, USA, PAGE(S) 335 - 357, XP008149458, ISBN: 978-3-527-31496-6 [gefunden am 2008-02-05] das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/064974

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010063378 A1	10-06-2010	AU 2009321813 A1	23-06-2011
		CA 2745006 A1	10-06-2010
		CN 102239145 A	09-11-2011
		CO 6361850 A2	20-01-2012
		CU 20110124 A7	31-01-2012
		DO P2011000162 A	30-06-2011
		EC SP11011092 A	30-06-2011
		EP 2373619 A1	12-10-2011
		JP 2012510482 A	10-05-2012
		KR 20110095912 A	25-08-2011
		MA 32835 B1	01-11-2011
		SG 171827 A1	28-07-2011
		US 2010261608 A1	14-10-2010
		WO 2010063378 A1	10-06-2010

3-(BIFENIL-3-IL)-4-HIDROXI-8-METOXI-1-AZAESPIRO[4.5]DEC-3-EN-2-ONAS SUSTITUIDAS

La presente invención se relaciona con 3-(bifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-onas sustituidas, en particular para fines terapéuticos; con composiciones farmacéuticas que comprenden a los compuestos de acuerdo con la invención y con su uso en terapias, en particular para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

Las acetil-CoA carboxilasas (ACC) cumplen un rol clave en la homeostasis de ácidos grasos celulares. Las ACC son enzimas que contienen biotina que catalizan la carboxilación de la acetil-CoA en malonil-CoA de una manera ATP-dependiente (Kim, 1997; Harwood, 2005; Tong, 2005). Esta reacción, que tiene lugar como dos hemi-reacciones, una reacción con biotina carboxilasa (BC) y una reacción con carboxiltransferasa (CT), es el primer paso introductorio de la biosíntesis de ácidos grasos y es el paso determinante de la velocidad de la vía. Se conocen dos isoformas de ACC humana, ACC1 y ACC2, codificadas por dos genes diferentes (LuTFI ABU-ELHEIGA et al, 1995, Jane WIDMER, et al., 1996). El ACC1 se expresa en el tejido lipogénico (hígado, tejido graso), se localiza en el citosol y llena el acumulación de malonil-CoA que sirve como donante de unidades de C2 para la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena larga por FASN y la subsiguiente extensión de cadenas. La ACC2 se expresa fundamentalmente en los tejidos oxidativos (hígado, corazón, músculo esquelético) (Bian-

chi et al., 1990; Kim, 1997), está asociada con las mitocondrias y regula la segunda acumulación de malonil-CoA. Esto permite regular la oxidación de los ácidos grasos por inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa I, la enzima que facilita la entrada de los ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias para la β -oxidación (Milgraum LZ, et al., 1997, Widmer J. et al., 1996).

Ambas enzimas presentan una homología de secuencia muy elevada y están reguladas de una manera similar mediante una combinación de mecanismos de transcripción, de traducción y de postraducción. Tanto en humanos como en animales, la actividad de ACC está altamente controlada por medio de numerosos mecanismos de de la dieta, hormonales y otros mecanismos fisiológicos, tal como activación alostérica directa por citrato, inhibición de la retroalimentación por ácidos grasos de cadena larga, fosforilación y/o inactivación o modulación reversible de la producción de enzimas por una expresión genética modificada.

Los ratones noqueados para ACC1 son embrionariamente letales (Swinnen, et al., 2006, Abu-Elheiga, et al., 2005). Los ratones noqueados para ACC2 presentan menores concentraciones de malonil-CoA en el músculo esquelético y cardíaco, una mayor oxidación de ácidos grasos en los músculos, niveles reducidos de grasas en hígado, cantidades reducidas de grasas corporales totales, mayores niveles de UCP3 en el músculo esquelético (como una indicación de mayor gasto de energía),

un menor peso corporal, concentraciones plasmáticas reducidas de ácidos grasos libres, niveles reducidos de glucosa en plasma, cantidades reducidas de glucógeno en los tejidos, y están protegidos contra la diabetes y obesidad inducida por la dieta (Abu-Elheiga et al., 2001, 2003; Oh et al., 2005). Además del compromiso en la síntesis de ácidos grasos en los tejidos lipogénicos y la oxidación de ácidos grasos en los tejidos oxidativos, en muchas células tumorales se observó una sobrerregulación de ACC y una mayor lipogénesis (Swinnen, et al., 2004, Heemers, et al., 2000, Swinnen, et al., 2002, Rossi, et al., 2003, Milgraum, et al., 1997, Yahagi, et al., 2005). Es muy probable que este fenotipo contribuya en el desarrollo y el progreso de tumores; sin embargo, aún resta clarificar los mecanismos reguladores involucrados.

EP0454782 y US5759837 protegen el uso de inhibidores de la síntesis de ácidos grasos para inhibir el crecimiento de células tumorales. No divulgan cetoenoles cíclicos.

Se han descubierto numerosas sustancias capaces de inhibir ACC de plantas y/o de insectos.

La Solicitud de Patente PCT, PCT/EP99/01787, publicada como WO 99/48869, que corresponde a la Patente Europea EP 1 066 258 B1, se refiere a nuevos cetoenoles cíclicos sustituidos con arilfenilo, a una pluralidad de procesos para su preparación y a su uso como plaguicidas y herbicidas.

Las 3-acilpirrolidin-2,4-dionas ya fueron descritas en términos de sus propiedades farmacéuticas (S. Suzuki et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 15 1120 (1967)). Aún más, R. Schmierer y

H. Mildenberger (*Liebigs Ann. Chem.* 1985, 1095) han sintetizado N-fenilpirrolidin-2,4-dionas. Pero no se ha descrito la actividad biológica de estos compuestos.

En EP-A-0 262 399 y GB-A-2 266 888 se divulgan compuestos de una estructura similar (3-arilpirrolidin-2,4-dionas) pero, sin embargo, no se les conoce ninguna actividad herbicida, insecticida o acaricida. Se sabe que los derivados bicíclicos no sustituidos de 3-pirrolidin-2,4-diona (EP-A-355 599, EP-A-415 211 y JP-A-12-053 670) y los derivados monocíclicos no sustituidos de 3-arilpirrolidin-2,4-diona (EP-A-377 893 y EP-A-442 077) tienen actividad herbicida, insecticida o acaricida.

También son conocidos los derivados policíclicos de 3-arilpirrolidin-2,4-diona (EP-A-442 073) y los derivados de 1H-arilpirrolidindiona (EP-A-456 063, EP-A-521 334, EP-A-596 298, EP-A-613 884, EP-A-613 885, WO 95/01 971, WO 95/26 954, WO 95/20 572, EP-A-0 668 267, WO 96/25 395, WO 96/35 664, WO 97/01 535, WO 97/02 243, WO 97/36 868, WO 97/43275, WO 98/05638, WO 98/06721, WO 98/25928, WO 99/24437, WO 99/43649, WO 99/48869, WO 99/55673, WO 01/17972, WO 01/23354, WO 01/74770, WO 03/013249, WO 03/062244, WO 2004/007448, WO 2004/024688, WO 04/065366, WO 04/080962, WO 04/111042, WO 05/044791, WO 05/044796, WO 05/048710, WO 05/049569, WO 05/066125, WO 05/092897, WO 06/000355, WO 06/029799, WO 06/056281, WO 06/056282, WO 06/089633, WO 07/048545, DEA 102 00505 9892, WO 07/073856, WO 07/096058, WO 07/121868, WO 07/140881, WO 08/067873, WO 08/067910, WO 08/067911, WO

08/138551, WO 09/015801, WO 09/039975, WO 09/049851, WO 09/115262, WO10/052161, WO 10/063378, WO 10/063670, WO10/063380, WO10/066780, WO10/102758, WO2010/135914, WO2011/067131, WO2011/067135, WO2011/067203 y WO2011/067240).

Son conocidas además las 1H-arilpirrolidin-2,4-dionas sustituidas con cetal de WO 99/16748 y las arilpirrolidindionas sustituidas con (espiro)cetal sustituidas con N-alcoxialcoxi JP-A-14 205 984 e Ito M. et al., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 1230-1238, (2003). Aún más, en WO 06/024411 se divulgan composiciones herbicidas que comprenden cetoenoles.

En WO 2008/022725 se divulgan derivados del ácido tetrónico sustituidos con 4'-bifenilo para las terapias de trastornos virales.

En WO 2005/089118 y WO2007/039286 se divulgan, de una manera general, estructuras bicíclicas que contienen nitrógeno para terapias; sin embargo, no se mencionan específicamente los cetoenoles cíclicos sustituidos con 5'-bifenilo.

El arte anterior más cercano en términos estructurales puede representarse por compuestos que tienen un grupo metilo en lugar de un grupo trifluorometilo o un grupo metoximetilo en la posición 8 del sistema de anillos azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona. Algunos de aquellos compuestos forman parte del arte anterior y se divulgan, por ejemplo, en WO10/063378.

El arte anterior más cercano en términos estructurales también puede representarse por compuestos que tienen un átomo

de hidrógeno en lugar de un grupo metoxi en la posición 8 del sistema de anillos azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona. Algunos de aquellos compuestos forman parte del arte anterior y se divulgan, por ejemplo, en WO 07/048545 (Ejemplo I-1-a-5).

En este caso, WO 10/063378 y WO 07/048545 se relacionan con invenciones que pertenecen a otro campo, a saber, el campo de los herbicidas.

Sin excepción, las estructuras más cercanas del arte anterior son conocidas del campo de los herbicidas, los insecticidas o los fungicidas. Para estas estructuras, en primer lugar no se sabe y en segundo lugar no es previsible si pueden inhibir a la ACC humana. Aún más, se desconoce y es imprevisible si estas estructuras son selectivas contra una de las isoformas de ACC humana.

Sobre la base de este arte anterior, un objeto de la presente invención comprende proveer estructuras para la terapia de trastornos veterinarios y en humanos.

En particular, las estructuras de acuerdo con la invención deberían ser adecuadas para la profilaxis y la terapia de trastornos neoplásicos y presentan ventajas con respecto a las estructuras conocidas en el arte anterior.

Lo que se proporcionarán son, en particular, estructuras para la terapia de trastornos que inhiben fuertemente la ACC1 humana. Las estructuras buscadas deberían inhibir la ACC1 humana más fuertemente que la ACC2 humana, es decir, deberían ser selectivas contra la ACC2 humana.

Preferiblemente, las estructuras provistas para la terapia

de trastornos también deberían presentar adicionalmente uno, mejor aún más de uno o en el mejor de los casos todas las siguientes propiedades:

- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, inhiben la ACC1 humana con un valor de IC50 menor que 300 nM, aún mejor menor que 200 nM y aún mejor todavía menor que 100 nM en el ensayo descrito,
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, inhiben a la ACC2 humana con un valor de IC50 mayor que 0,5 μ M, aún mejor mayor que 1,5 μ M y aún mejor todavía mayor que 2 μ M en el ensayo descrito,
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, la relación entre el valor de la IC50 para la inhibición de la ACC2 humana y el valor de IC50 para la inhibición de la ACC1 humana es de por lo menos un factor de 8, aún mejor por lo menos un factor de 15 y aún mejor todavía por lo menos un factor de 20.
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, inhiben la proliferación de células tumorales de la línea celular MCF7 con un valor de IC50 menor que 250 nM, aún mejor menor que 100 nM y aún mejor todavía menor que 50 nM en el ensayo descrito,
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo

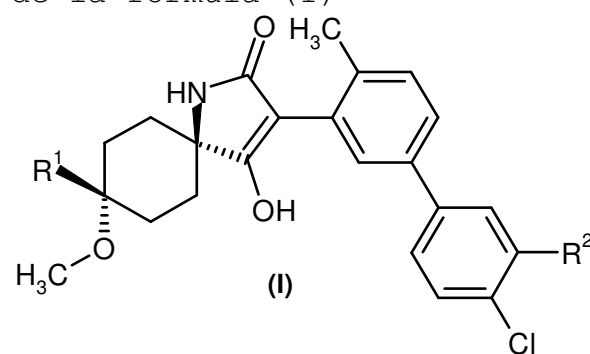
con la media de una pluralidad de mediciones, tienen un valor de logP/D menor que 3, aún mejor menor que 2,5 en el ensayo descrito,

- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, tienen un valor de logMA menor que 3, aún mejor menor que 2,5, aún mejor todavía menor que 2 en el ensayo descrito,
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, tienen una constante de unión a la proteína HSA de más de 1 $\mu\text{mol/l}$ en el ensayo descrito,
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, tienen una fracción libre de más del 0,1%, aún mejor de más del 0,2%, con respecto a la unión a la proteína plasmática humana en el ensayo descrito.
- de acuerdo con una sola medición o aún mejor de acuerdo con la media de una pluralidad de mediciones, presentan una relación de las fracciones libres con respecto a la unión a la proteína plasmática de ratón y la proteína plasmática humana de un factor menor que 15, aún mejor menor que 10,
- tienen una relación de las fracciones libres con respecto a la unión a la proteína plasmática de diversas especies que conduce a un dosis humana estimada aceptable,
- tienen parámetros farmacocinéticos que conducen a una

dosis humana estimada aceptable y que permiten su administración como un medicamento,

- tienen una depuración baja,
- tienen una biodisponibilidad elevada,
- tienen un volumen de distribución moderada a alta,
- tienen una biodisponibilidad relativa aceptable que conduce a una dosis humana estimada aceptable y que permite su administración como un medicamento,
- tienen una vida media en humanos estimada de no más que dos semanas,
- tienen actividad *in vivo* en el modelo en ratón de xenoinjerto de PC3,
- tienen actividad en el modelo en ratón de xenoinjerto de PC3 con niveles en plasma que conducen a una dosis humana estimada aceptable,
- su dosis diaria en humanos estimada con el método descrito es menor que 2 g, aún mejor menor que 1 g, por paciente.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que los compuestos de la fórmula (I)



donde

R^1 representa un grupo trifluorometilo o metoximetilo y

R² representa hidrógeno o flúor,

y sus sales

son particularmente adecuados en las terapias de trastornos y permiten cumplir con el objeto de la invención.

En este caso no era previsible que las estructuras, y cuál de ellas, conocidas como insecticidas o herbicidas, permitieran alcanzar el objeto de la invención, es decir, que representaran una estructura que se puede usar en terapias para trastornos en humanos y/o animales.

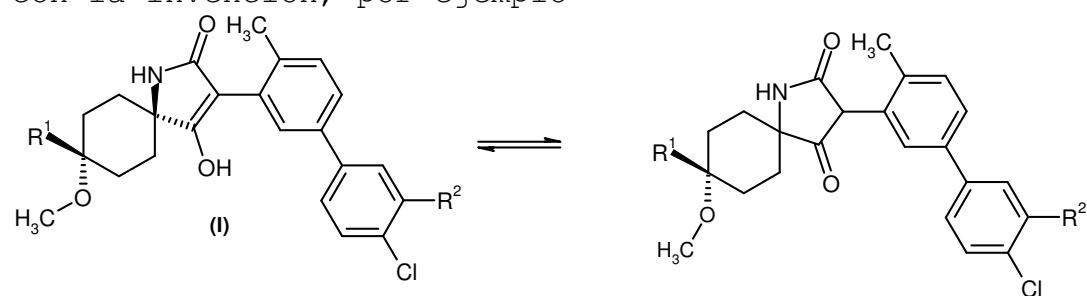
Era aún menos previsible que las estructuras, y cuál de ellas, conocidas como insecticidas o herbicidas, inhibieran la ACC humana, y menos aún que presentaran selectividad, y cuál de ellas lo hiciera, contra una de las isoformas humanas.

En el gran grupo de cetoenoles cíclicos conocidos como insecticidas, fungicidas o herbicidas, los compuestos de la fórmula (I) sorprendentemente se distinguen por su buena inhibición enzimática de la ACC1 humana. En este caso, los compuestos de acuerdo con la invención tienen una mayor selectividad contra la ACC2 humana y particularmente inhiben la ACC1. Esta propiedad no era previsible y califica a los compuestos de acuerdo con la invención para terapias con efectos secundarios reducidos. Los efectos secundarios indeseados probablemente son causados por la inhibición simultánea de las ACC2 humanas, en tanto los efectos se basan fundamentalmente en la inhibición de las ACC1 humanas.

La selectividad contra la ACC2 humana parece basarse estructuralmente en el grupo trans-metoxi en la posición 8 del sistema de anillos de azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona de las estructuras de acuerdo con la invención. Si este grupo trans-metoxi ya sea había realizado en las estructuras relacionadas del arte anterior, se desconocía en el momento de la invención si la selectividad, y el tipo de selectividad, de estas estructuras podía inhibir las ACC humanas.

La presente invención también abarca el uso de las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención.

La presente invención también abarca el uso de las formas tautoméricas de los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con la invención, por ejemplo



Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención también incluyen sales de bases convencionales, tales como, a modo de ejemplo y con preferencia, sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales de metales alcalino-térreos (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas que tienen entre 1 y 16 átomos de carbono, tales como, a modo de ejemplo y con pre-

ferencia, etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicilohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y *N*-metilpiperidina.

La presente invención provee además medicamentos que comprenden a los compuestos de acuerdo con la invención y por lo menos uno o más compuestos activos adicionales, en particular para la profilaxis y/o la terapia de trastornos neoplásicos.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden actuar de forma sistémica y/o local. Para tal fin, se puede administrar de una manera adecuada, por ejemplo por una ruta oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dérmica, transdérmica, conjuntiva, ótica, o como un implante o un *Stent*.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden administrar en formas de administración adecuadas para estas rutas de administración.

Las formas de administración adecuadas para una administración por vía oral son aquellas que funcionan de acuerdo con el arte anterior, que liberan los compuestos de acuerdo con la invención de manera rápida y/o de una manera modificada, y que contienen a los compuestos de la invención en forma cristalina y/o amorfa y/o disuelta, por ejemplo como tabletas (tabletas no recubiertas o recubiertas, por ejemplo con re-

cubrimientos resistentes a los jugos gástricos o que se disuelven con un retardo o que son insolubles que controlan la liberación del compuesto de acuerdo con la invención), tabletas o películas/oblas que se desintegran rápidamente en la cavidad oral, películas/liofilizados, cápsulas (por ejemplo cápsulas de gelatina dura o blanda), tabletas recubiertas con azúcar, gránulos, pélets, polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones.

La administración parenteral puede pasar por alto el paso de absorción (por ejemplo por vía intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbar) o puede incluir absorción (por ejemplo por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración apropiadas para administración parenteral incluyen preparaciones para inyección e infusión en la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Para las otras rutas de administración son ejemplos apropiados los medicamentos para inhalación (inclusive inhaladores para polvos, nebulizadores), gotas nasales, soluciones, aerosoles; tabletas para una administración lingual, sublingual o bucal, películas/oblas o cápsulas, supositorios, preparados óticos u oftalmológicos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas de múltiples fases), suspensiones lipofílicas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (por ejemplo parches), leche, pastas, espumas, polvos para espolvorear, implantes o Stents.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden convertir en las formas de administración mencionadas. Esto se puede lograr de una forma conocida *per se*, por mezclado con auxiliares inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados. Estos auxiliares incluyen vehículos (por ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), solventes (por ejemplo polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizantes (por ejemplo antioxidantes tal como ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo pigmentos inorgánicos tales como óxidos de hierro) y correctores del sabor y/o del olor.

La presente invención provee además medicamentos que comprenden los compuestos de acuerdo con la invención, típicamente junto con uno o más auxiliares inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados, y el uso de los mismos para los fines mencionados previamente.

La formulación de los compuestos de acuerdo con la invención para obtener preparaciones farmacéuticas se efectúa de la manera conocida *per se*, por conversión de el o los compuestos activos en la forma de administración deseada con los auxiliares utilizados comúnmente en la formulación farmacéutica. Los auxiliares usados pueden ser, por ejemplo, vehículos, rellenos, desintegrantes, aglutinantes, humectantes, deslizantes, absorbentes y adsorbentes, diluyentes, solventes,

cosolventes, emulsionantes, solubilizantes, correctores del sabor, colorantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, sales para modificar la presión osmótica o soluciones amortiguadoras.

Se hace referencia a *Remington's Farmacéuticas Science*, 15^a ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980).

Las formulaciones farmacéuticas se pueden encontrar:

en una forma sólida, por ejemplo como tabletas, tabletas recubiertas con azúcar, píldoras, supositorios, cápsulas, sistemas transdérmicos.

en una forma semisólida, por ejemplo como ungüentos, cremas, geles, supositorios, emulsiones, o

en una forma líquida, por ejemplo como soluciones, tinturas, suspensiones o emulsiones.

Los auxiliares usados en el contexto de la invención pueden ser, por ejemplo, sales, sacáridos (mono, di, tri, oligo y/o polisacáridos), proteínas, aminoácidos, péptidos, grasas, ceras, aceites, hidrocarburos y derivados de los mismos, y los auxiliares pueden ser de origen natural o sintético o parcialmente sintético.

Las formas útiles para una administración oral o peroral comprenden en especial tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, pastillas, suspensiones, emulsiones o soluciones.

Las formas útiles para una administración parenteral comprenden en especial suspensiones, emulsiones, y particularmente soluciones.

La presente invención se relaciona con los compuestos de acuerdo con la invención.

Se pueden usar para la profilaxis y terapia de trastornos en humanos, en particular trastornos neoplásicos.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar en particular para inhibir o reducir la proliferación de células y/o la división celular y/o para inducir apoptosis.

Los compuestos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para la profilaxis y/o terapia de trastornos hiperproliferativos tales como, por ejemplo,

- psoriasis,
- queloides y otras hiperplasias de la piel,
- hiperplasias de próstata benignas (BPH),
- tumores sólidos y
- tumores hematológicos.

Los tumores sólidos que pueden ser tratados de acuerdo con la invención son, por ejemplo, tumores de la mama, del tracto respiratorio, de cerebro, de los órganos reproductores, del tracto gastrointestinal, del tracto urogenital, de los ojos, de hígado, de la piel, de cabeza y cuello, de la glándula tiroides, de la glándula paratiroides, de hueso y del tejido conectivo y las metástasis de estos tumores.

Los tumores hematológicos que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo,

- mieloma múltiple
- linfomas o
- leucemias

Los tumores de mama que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo,

- carcinomas de mama con estado de receptores hormonales positivo
- carcinomas de mama con estado de receptores hormonales negativo
- carcinomas de mama positivos para Her-2
- carcinomas de mama negativos para receptores hormonales y Her-2
- carcinomas de mama asociados con BRCA
- carcinoma de mama inflamatorio.

Los tumores del tracto respiratorio que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo,

- carcinomas bronquiales de células no pequeñas y
- carcinomas bronquiales de células pequeñas.

Los tumores de cerebro que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo,

- gliomas,
- glioblastomas,
- astrocitomas,
- meningiomas y
- meduloblastomas.

Los tumores de los órganos reproductores masculinos que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- carcinomas de próstata,
- tumores de testículo malignos y
- carcinomas de pene.

Los tumores de los órganos reproductores femeninos que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- carcinomas de endometrio
- carcinomas cérvicouterino
- carcinomas de ovario
- carcinomas vaginales
- carcinomas de vulva

Los tumores del tracto gastrointestinal que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- carcinomas colorrectales
- carcinomas anales
- carcinomas de estómago
- carcinomas de páncreas
- carcinomas de esófago
- carcinomas de vesícula biliar
- carcinomas del intestino delgado
- carcinomas de las glándulas salivales
- tumores neuroendócrinos
- tumores del estroma gastrointestinal

Los tumores del tracto urogenital que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- carcinomas de vejiga urinaria
- carcinomas de células renales
- carcinomas de la pelvis renal y del tracto urinario inferior

Los tumores de los ojos que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- retinoblastomas
- melanomas intraoculares

Los tumores de hígado que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo

- carcinomas hepatocelulares
- carcinomas colangiocelulares

Los tumores de la piel que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- melanomas malignos
- basaliomas
- espinaliomas
- sarcomas de Kaposi
- carcinomas de células de Merkel

Los tumores de cabeza y cuello que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- carcinomas de laringe
- carcinomas de la faringe y la cavidad oral

Los sarcomas que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- sarcomas de tejido blando
- osteosarcomas

Los linfomas que pueden ser tratados comprenden, por ejemplo:

- linfomas no Hodgkin
- linfomas de Hodgkin
- linfomas cutáneos
- linfomas del sistema nervioso central
- linfomas asociados a SIDA

Las leucemias que pueden ser tratadas comprenden, por ejemplo:

- leucemias mieloides agudas
- leucemias mieloides crónicas
- leucemias linfáticas agudas
- leucemias linfáticas crónicas
- leucemias de células pilosas

Ventajosamente, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para la profilaxis y/o terapia de:

carcinomas de mama, en particular negativos para receptores hormonales, positivos para receptores hormonales, o

carcinomas de mama asociados con BRCA, y también

carcinomas de páncreas, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, melanomas malignos y otros tumores de piel, carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinoma de endometrio,

carcinomas colorrectales y carcinomas de próstata.

De manera particularmente ventajosa, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, en particular carcinomas de mama positivos para receptores hormonales, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata, en particular carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

Estos trastornos están bien caracterizados en el hombre, pero también existen en otros mamíferos.

La presente solicitud provee los compuestos de la fórmula

(I) de acuerdo con la invención, en particular los siguientes compuestos:

- (5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona
- (5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona
- (5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona
- (5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona

La presente solicitud provee además los compuestos de acuerdo con la invención para su uso como medicamentos, en especial para la profilaxis y/o la terapia de trastornos neoplásicos. La presente solicitud provee además los compuestos de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas de páncreas, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, melanomas malignos y otros tumores de piel, carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinomas de endometrio, carcinomas colorrectales o carcinomas de próstata.

La presente solicitud provee además los compuestos de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, en particular carcinomas de mama positivos para receptores hormonales, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata, en particular carcinomas de próstata negativos

para receptores de andrógenos o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

La invención provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para preparar un medicamento.

La presente solicitud provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

La presente solicitud provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas de páncreas, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, melanomas malignos y otros tumores de piel, carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinomas de endometrio, carcinomas colorrectales o carcinomas de próstata.

La presente solicitud provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, en particular carcinomas de mama positivos para receptores hormonales, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata, en particular carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

La presente solicitud provee además el uso del compuesto para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

La presente solicitud provee además el uso de los compuestos

de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas de páncreas, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, melanomas malignos y otros tumores de piel, carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinomas de endometrio, carcinomas colorrectales o carcinomas de próstata.

La presente solicitud provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, en particular carcinomas de mama positivos para receptores hormonales, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata, en particular carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

La presente solicitud provee además formulaciones farmacéuticas en la forma de tabletas que comprenden uno de los compuestos de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas de páncreas, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, melanomas malignos y otros tumores de piel, carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinomas de endometrio, carcinomas colorrectales o carcinomas de próstata.

La presente solicitud provee además formulaciones farmacéuticas en la forma de tabletas que comprenden uno de los compuestos de acuerdo con la invención para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, en particular carcinomas de mama positivos para receptores hormonales, carcinomas co-

lorrectales, carcinomas de próstata, en particular carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

La invención provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento de trastornos asociados con procesos proliferativos.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar por sí mismos o, si fuera necesario, en combinación con una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales, siempre que esta combinación no conduzca a efectos secundarios indeseables e inaceptables. Por lo tanto, la presente invención provee además medicamentos que comprenden un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más compuestos activos adicionales, en particular para la profilaxis y/o terapia de los trastornos mencionados previamente.

Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden combinar con sustancias antihiperproliferativas, citostáticas o citotóxicas conocidas para el tratamiento de cáncer. La combinación de los compuestos de acuerdo con la invención con otras sustancias usadas comúnmente para el tratamiento de cáncer, o de lo contrario con una radioterapia, resulta particularmente apropiada.

Los ejemplos de compuestos activos adecuados para una combinación incluyen:

afinitor, aldesleuquina, ácido alendrónico, alfaferona, alitretinoína, alopurinol, aloprim, aloxi, altretamina, aminoglutetimida, amifostina, amrubicina, amsacrina, anastrozol,

anzmet, aranesp, arglabina, trióxido de arsénico, aromasina, 5-azacitidina, azatioprina, BCG o *tice* BCG, bestatina, acetato de betametasona, fosfato de betametasona sódica, bexaroteno, sulfato de bleomicina, broxuridina, bortezomib, busulfán, calcitonina, campat, capecitabina, carboplatino, casodex, cefesona, celmoleuquina, cerubidina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, cladribina, ácido clodrónico, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunoxoma, decadrón, fosfato de decadrón, delestrógeno, denileuquina diftitox, depomedrol, deslorelina, dexrazoxano, dietilestilbestrol, diflucano, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, dronabinol, DW-166HC, eligard, elitek, ellence, emend, epirubicina, epoetina alfa, epógeno, eptaplatino, ergamisol, estrace, estradiol, fosfato de estramustina sódica, etinilestradiol, etiol, ácido etidrónico, etopofos, etopósido, fadrozol, farstón, filgrastim, finasteride, fligrastim, floxuridina, fluconazol, fludarabina, monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo (5-FU), fluoximesterona, flutamida, formestane, fosteabine, fotemustina, fulvestrant, gammagard, gemcitabine, gemtuzumab, gleevec, gliadel, goserelina, granisetron clorhidrato, histrelina, hica mtina, hidro cortona, eritro-hidroxinoniladenina, hidroxurea, ibritumomab tiuxetano, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, interferón-alfa 2, interferón alfa-2 α , interferón alfa-2 β , interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta, interferón gamma-1 α , interleuquina-2, intrón A,

iressa, irinotecano, kitrilo, lapatinib, sulfato de lentinan, letrozol, leucovorina, leuprolida, acetato de leuprolida, levamisol, sal de calcio del ácido levofólico, levotroide, levoxilo, lomustina, lonidamina, marinol, mecloretamina, mecobalamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, menest, 6-mercaptopurina, mesna, metotrexato, metvix, miltefosina, minociclina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, modrenal, miocet, nedaplatino, neulasta, neumega, neupogen, nilutamida, nolvadex, NSC-631570, OCT-43, octreotida, ondansetrón clorhidrato, orapred, oxaliplatino, paclitaxel, pediapred, pegaspargasa, pegasis, pentostatina, picibanilo, pilocarpina clorhidrato, pirarubicina, plicamicina, porfímero sódico, prednimustina, prednisolona, prednisona, premarina, procarbazona, procrit, raltitrexed, RDEA119, rebif, etidronato de renio-186, rituximab, roferón-A, romurtida, salagen, sandostatina, sargramostim, semustina, sizofiran, sobuzoxano, solu-medrol, estreptozocina, cloruro de estroncio-89, sintroide, tamoxifeno, tamsulosina, tasonermino, tastolactona, taxotere, teleleuquina, temozolomida, tenipósido, propionato de testosterona, testred, tioguanina, tiotepa, tirotropina, ácido tiludrónico, topotecano, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, treosulfán, tretinoína, trexal, trimetilmelamina, trimetrexato, acetato de triptorelina, pamoato de triptorelina, UFT, uridina, valrubicina, vesnarinona, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, virulizina, zinecard, es-

timalamer zinostatina, zofrán, ABI-007, acolbifeno, actinmune, afinitak, aminopterina, arzoxifeno, asoprisnilo, atamestano, atrasentán, BAY 43-9006 (sorafenib), avastina, CCI-779, CDC-501, celebrex, cetuximab, crisnatol, acetato de ciproterona, decitabina, DN-101, doxorubicina-MTC, dSLIM, dutasterida, edotecarina, eflornitina, exatecan, fenretinide, diclorhidrato de histamina, implante de hidrogel de histrelina, holmio-166 DOTMP, ácido ibandronico, interferón gamma, intrón-PEG, ixabepilona, hemocianina de lapa, L-651582, lanreotide, lasofoxifeno, libra, lonafarnib, miproxifeno, minodronato, MS-209, MTP-PE liposómico, MX-6, nafarelina, nemorubicina, neovastat, nolatrexed, oblimersen, onco-TCS, osidem, paclitaxel poliglutamato, pamidronato disódico, PN-401, QS-21, quazepam, R-1549, raloxifeno, ranpirnase, ácido 13-cis-retinoico, satraplatino, seocalcitol, T-138067, tarceva, taxoprexina, timosina-alfa-1, tiazofurina, tipifarnib, tirapazamina, TLK-286, toremifeno, TransMID-107R, valspodar, vaporeotida, vatalanib, verteporfina, vinflunina, Z-100, ácido zoledrónico o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización preferida, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden combinar con agentes antihiperproliferativos, de los cuales se ofrecen ejemplos en la siguiente lista no exhaustiva:

aminoglutetimida, L-asparaginasa, azatioprina, 5-azacitidina, bleomicina, busulfán, carboplatino, carmustina, clo-

rambucilo, cisplatino, colaspasa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dietilestilbestrol, 2',2'-difluorodesoxicitidina, docetaxel, doxorubicina (adriamicina), epirubicina, epotilona y sus derivados, eritro-hidroxinoniladenina, etinilestradiol, etopósido, fosfato de fludarabina, 5-fluorodesoxiuridina, monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, hexametilmelamina, hidrox urea, caproato de hidroxiprogesterona, idarubicina, ifosfamida, interferón, irinotecano, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, 6-mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, paclitaxel, pentostatina, N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), plicamicina, prednisolona, prednisona, procarbazona, raloxifeno, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, propionato de testosterona, tioguanina, tiotepa, topotecano, trimetilmelamina, uridina, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

En un sentido muy promisorio, los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden combinar con fármacos biológicos tales como anticuerpos (por ejemplo Avastina, Rituxán, Erbitux, Herceptina) y proteínas recombinantes.

Los compuestos de acuerdo con la invención también permiten obtener efectos positivos en combinación con otras terapias dirigidas contra una angiogénesis, por ejemplo con Avastina, axitinib, regorafenib, recentina, sorafenib o sunitinib. Las combinaciones con inhibidores del proteasoma y de mTOR, y

también las antihormonas y los inhibidores enzimáticos del metabolismo de esteroides, son particularmente adecuadas debido a su perfil favorable de efectos secundarios.

En general, se puede buscar cumplir con las siguientes metas usando una combinación de los compuestos de acuerdo con la invención con otros agentes citostáticamente o citotóxicamente activos:

- mayor eficacia en retardar el crecimiento de un tumor, en la reducción de su tamaño o aún en la eliminación completa del mismo, en comparación con el tratamiento usando un compuesto activo individual;
- la posibilidad de usar los fármacos quimioterapéuticos a una menor dosificación que en el caso de una monoterapia;
- la posibilidad de una terapia más tolerable con menos efectos secundarios en comparación con una administración individual;
- la posibilidad de tratar un espectro más amplio de tumores;
- la posibilidad de obtener un índice de respuesta más alto a la terapia;
- un mayor tiempo de supervivencia del paciente en comparación con una terapia estándar de hoy en día.

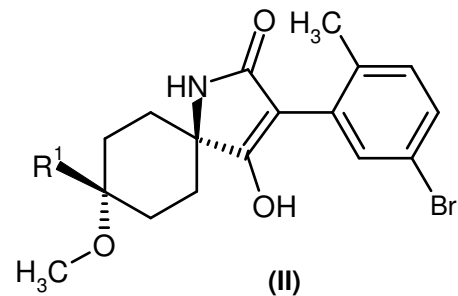
Además, los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden usar junto con una radioterapia y/o con una intervención quirúrgica.

1. Rutas de síntesis para los compuestos de la fórmula (I)

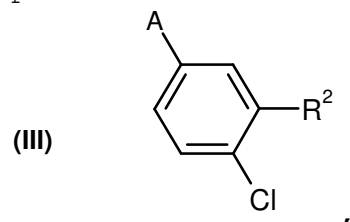
Los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante las rutas de síntesis A y/o B.

Ruta de síntesis A

Un derivado de bromuro de arilo de la fórmula (II)



en donde R^1 tiene el significado indicado previamente, se hace reaccionar en un acoplamiento de Suzuki con los compuestos de la fórmula (III)



en donde R^2 tiene el significado indicado previamente y A representa $-B(OH)_2$, un éster borónico, preferiblemente un pinacol éster del ácido borónico, o $-BF_3^-K^+$.

Los acoplamientos de Suzuki generalmente se llevan a cabo en solventes inertes, en la presencia de un catalizador, si fuera apropiado en la presencia de un reactivo adicional, preferiblemente en un rango de temperaturas de entre temperatura ambiente y 130 °C a presión atmosférica. Las reacciones también se pueden conducir en un recipiente cerrado con calentamiento en un horno de microondas.

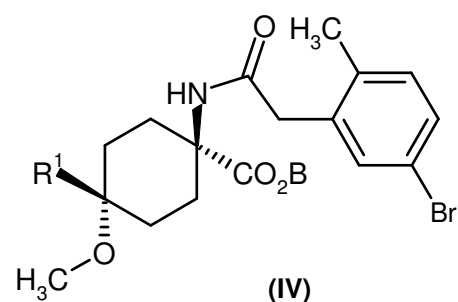
Los catalizadores son, por ejemplo, los catalizadores comunes de paladio para las condiciones de una reacción de Suzuki;

se prefieren los catalizadores tales como diclorobis(trifenilfosfina)paladio, tetrakistrifenilfosfinpaladio(0), paladio sobre carbón, acetato de paladio(II), acetato de paladio(II)/trisciclohexilfosfina, acetoacetato de paladio(II)/tetrafluoroborato de tri-ter-butilfosfonio, un complejo de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio/diclorometano o acetato de paladio(II) con un ligando tal como diciclohexil[2',4',6'-tri(propan-2-il)bifenil-2-il]fosfano.

Otros reactivos adicionales comprenden, por ejemplo, acetato de potasio o acetato de cesio, carbonato de cesio, carbonato de potasio o carbonato de sodio, ter-butóxido de potasio, fluoruro de cesio, fosfato de potasio o hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, siendo preferidos los reactivos adicionales tales como carbonato de cesio y/o una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Los solventes inertes comprenden, por ejemplo, éteres tales como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, hidrocarburos tales como benceno, xileno o tolueno, o carboxamidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida o N-metilpiperidona o alquilsulfóxidos tal como dimetilsulfóxido, o mezclas de los solventes con alcoholes tales como metanol o etanol y/o agua; se prefiere el 1,2-dimetoxietano.

Los compuestos de la fórmula (II) se pueden preparar por reacción de los compuestos de la fórmula (IV)



en donde R^1 tiene el significado indicado previamente y

B representa C1-C6-alquilo, preferiblemente etilo o metilo,

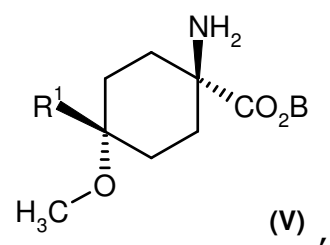
bajo condiciones de condensación de Dieckmann.

Las condensaciones de Dieckmann generalmente se llevan a cabo en solventes inertes en la presencia de una base, preferiblemente en un rango de temperaturas de entre temperatura ambiente y 130°C a presión atmosférica.

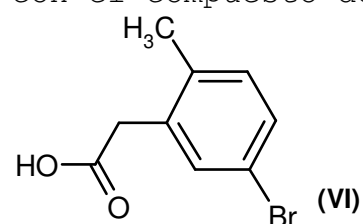
Las bases son, por ejemplo, alcóxidos de metales alcalinos o alcóxidos de metales alcalino-térreos tales como ter-butóxido de sodio o ter-butóxido de potasio, metóxido de sodio o etóxido de sodio; se prefiere el ter-butóxido de potasio.

Los solventes inertes comprenden, por ejemplo, éteres tales como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, hidrocarburos tales como benceno, xileno o tolueno, o carboxamidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida o N-metilpirolidona o alquilsulfóxidos tal como dimetilsulfóxido, o alcoholes tales como metanol o etanol; se prefiere dimetilformamida.

Los compuestos de la fórmula (IV) se pueden preparar por reacción de los compuestos de la fórmula (V) o una sal de los compuestos de la fórmula (V)



en donde R^1 y B tienen los significados indicados previamente con el compuesto de la fórmula (VI)



bajo condiciones de acoplamiento de amidas.

La reacción generalmente se lleva a cabo en solventes inertes inicialmente por reacción de los compuestos de la fórmula (VI) con cloruro de tionilo o un reactivo equivalente conocido por el especialista en el arte y en un segundo paso con compuestos de la fórmula (V) o una sal de los compuestos de la fórmula (V) en la presencia de una base tal como trietilamina o carbonato de potasio.

En un proceso alternativo, la reacción se puede llevar a cabo en solventes inertes en la presencia de un agente deshidratante, si fuera apropiado en la presencia de una base, preferiblemente en un rango de temperaturas entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a presión atmosférica.

Los solventes inertes comprenden, por ejemplo, hidrocarburos halogenados, tales como diclorometano o triclorometano, hidrocarburos, tales como benceno o tolueno, nitrometano, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, dimetilformamida o acetonitrilo. También es posible emplear mezclas de los solventes.

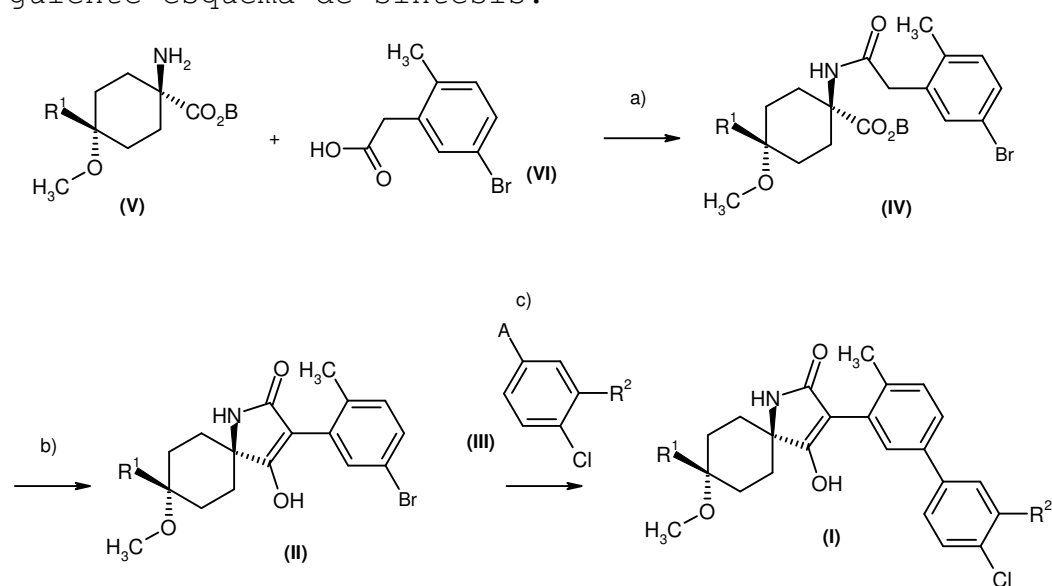
Se prefiere en particular los solventes de acetonitrilo, diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofurano o tolueno. Las bases son, por ejemplo, carbonatos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, carbonato de sodio o carbonato de potasio, o bicarbonato de sodio o bicarbonato de potasio, o bases orgánicas tales como trialkilaminas, por ejemplo trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, 4-dimetilaminopiridina o diisopropiletilamina.

Los agentes deshidratantes adecuados son, por ejemplo, carbodiimidas tales como, por ejemplo, *N,N'*-dietil-, *N,N*-dipropil-, *N,N*-diisopropil-, *N,N*-diciclohexil-carbodiimida, clorhidrato de *N*-(3-dimetilamino-isopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-ciclohexilcarbodiimida-*N'*-propiloximetilpoliestireno (PS-carbodiimida) o compuestos de carbonilo tal como carbonildiimidazol o compuestos de 1,2-oxazolio tal como 3-sulfato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio o perclorato de 2-*ter*-butil-5-metilisooxazolio o compuestos de acilamino tal como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina o anhídrido propanfosfónico o cloroformato de isobutilo o cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosforilo o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(2-oxo-1-(2-*H*)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU) o hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU) o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-(pirrolidin)-fosfonio (PyBOP) o *N*-

hidroxi-succinimida, o mezclas de los mismos, con bases.

Preferiblemente, la condensación se lleva a cabo con PyBOP, TBTU o con EDC en la presencia de HOBT.

El proceso descrito precedentemente se ilustra en el siguiente esquema de síntesis:



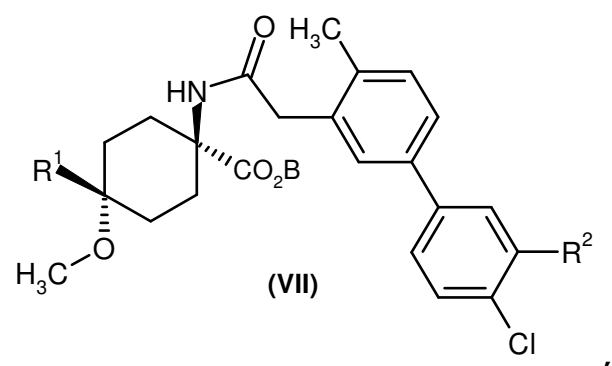
a): 1. SOCl_2 , 80 °C, 2. trietilamina, diclorometano, temperatura ambiente;

b): KOtBu , DMF, 80 °C;

c): catalizador de un complejo de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio/diclorometano, Cs_2CO_3 , 1,2-dimetoxietano/agua, reflujo.

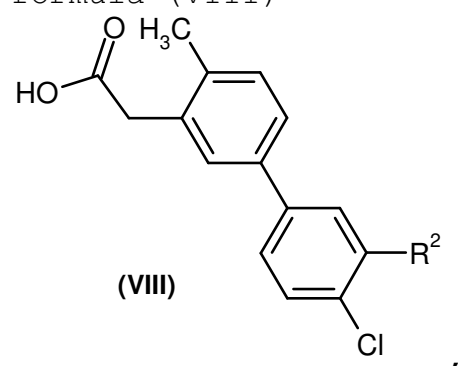
Ruta de síntesis B

Como alternativa, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con la invención se pueden preparar por reacción de un compuesto de la fórmula (VII)



en donde R^1 , R^2 y B tienen los significados indicados previamente bajo las condiciones expresadas previamente en la condensación de Dieckmann.

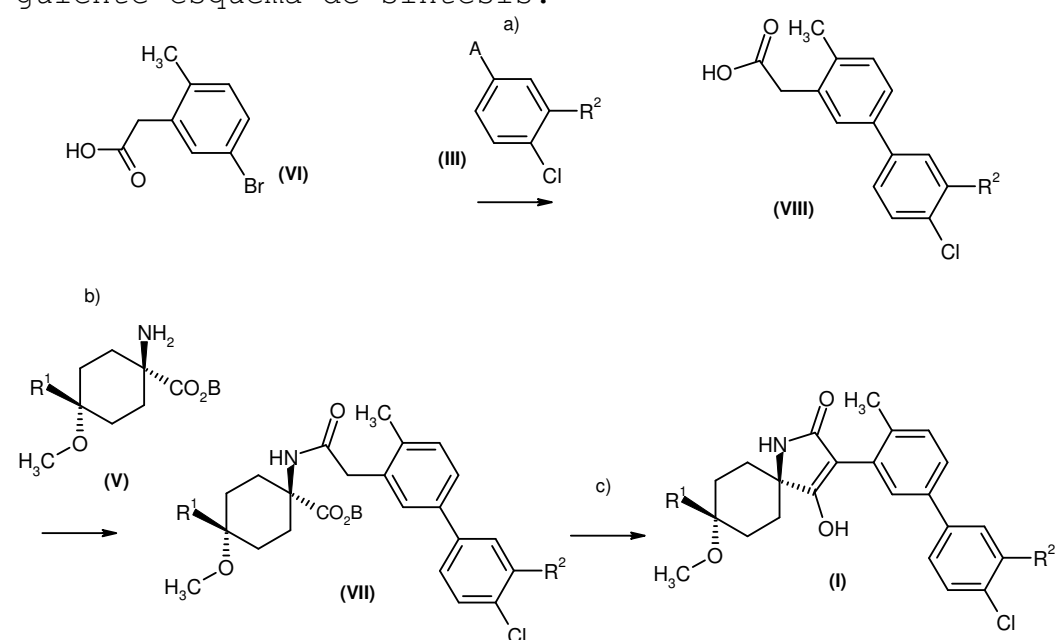
Los compuestos de la fórmula (VII) se pueden preparar por reacción de los compuestos de la fórmula (V) o una sal de los compuestos de la fórmula (V), en donde R^1 y B tienen los significados indicados previamente para los compuestos de la fórmula (VIII)



en donde R^2 tiene el significado indicado precedentemente bajo las condiciones de acoplamiento de amidas expresadas previamente.

Los compuestos de la fórmula (VIII) se pueden preparar haciendo reaccionar el compuesto de la fórmula (VI) en una reacción de Suzuki bajo las condiciones expresadas previamente con los compuestos de la fórmula (III) en donde R^2 y A tienen los significados indicados previamente.

El proceso descrito precedentemente se ilustra en el siguiente esquema de síntesis:

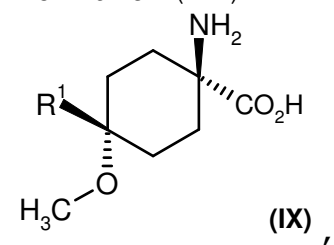


a): catalizador de acetilacetato de paladio(II), catalizador de tetrafluoroborato de tri-ter-butilfosfonio, NaOH, THF/agua;

b): 1. SOCl₂, 80 °C, 2. K₂CO₃, acetonitrilo, temperatura ambiente;

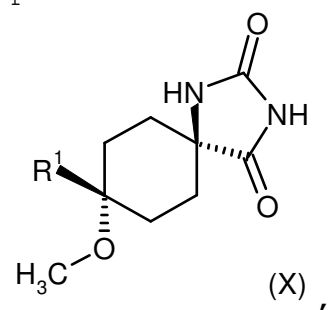
c): KOtBu, DMF, temperatura ambiente.

Los compuestos de la fórmula (V) o las sales de los compuestos de la fórmula (V) necesarios para las rutas de síntesis A y B, en donde R¹ y B tienen los significados indicados previamente, se pueden preparar por esterificación de los compuestos de la fórmula (IX) o una sal de los compuestos de la fórmula (IX)



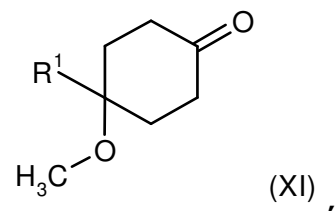
en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, mediante procesos conocidos, por ejemplo de manera análoga a WO2002/02532 o WO2010/063378.

Los compuestos de la fórmula (IX) o las sales de compuestos de la fórmula (IX), en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, se pueden preparar por clivaje de los compuestos de la fórmula (X)

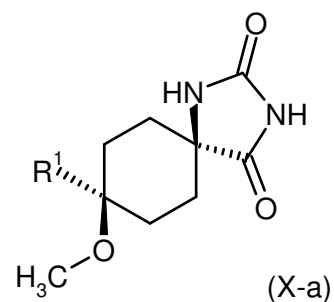


en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, mediante procesos conocidos, por ejemplo de manera análoga a WO2002/02532 o WO2010/063378.

Los compuestos de la fórmula (X), en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, se pueden preparar por reacción de los compuestos de la fórmula (XI)



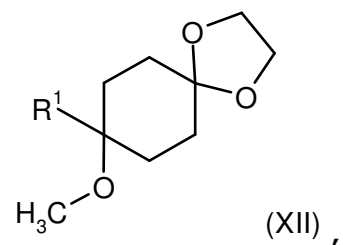
en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, mediante procesos conocidos en una reacción de Bucherer-Bergs, por ejemplo de manera análoga a WO2002/02532 o WO2010/063378. Durante la formación de la hidantoína de la fórmula (X), se obtienen mezclas de isómeros del isómero cis de la fórmula (X) y su isómero trans de la fórmula (X-a).



El isómero trans de la fórmula (X-a) se puede separar en este paso de síntesis. Como alternativa, la mezcla de isómeros se puede hacer reaccionar y el respectivo intermediario trans-isomérico se puede separar en uno de los pasos de síntesis adicionales o del producto final de la fórmula (I).

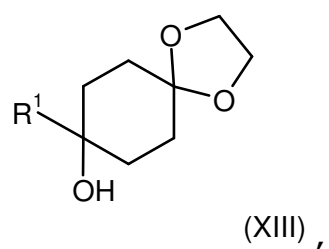
Como alternativa, con el uso de la síntesis de Strecker, es posible preparar, mediante procesos conocidos, a partir de las cetonas de la fórmula (XI), aminonitrilos que pueden ser hidrolizados mediante procesos conocidos en los aminoácidos de la fórmula (IX).

Los compuestos de la fórmula (XI), en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, se pueden preparar sometiendo los compuestos de la fórmula (XII)



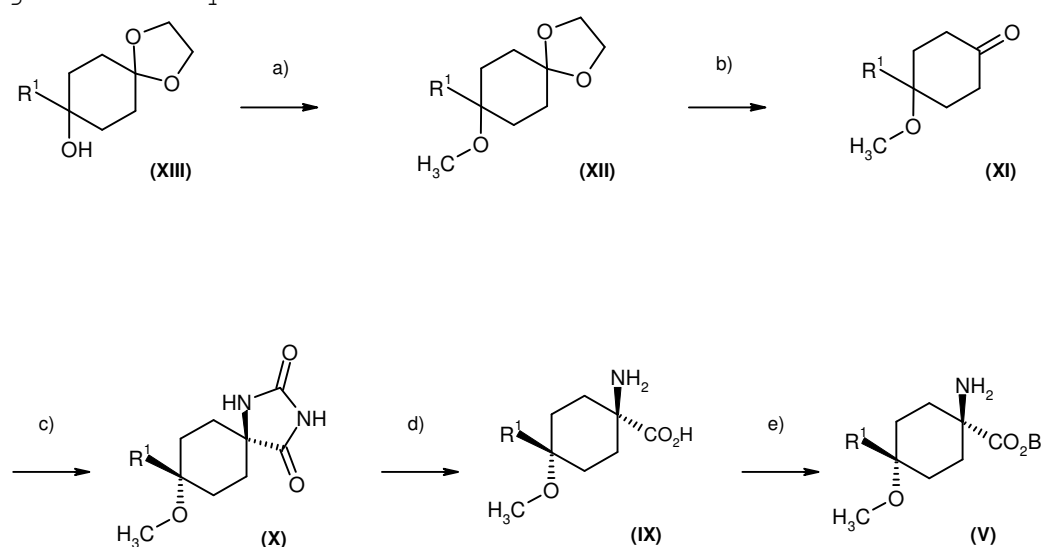
en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, a un clivaje con cetal (véase *Protective Groups in Organic Synthesis*; Theodora W. Greene).

Los compuestos de la fórmula (XII), en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, se pueden preparar por metilación de los compuestos de la fórmula (XIII)



en donde R^1 tiene el significado indicado precedentemente, mediante procesos conocidos, por ejemplo de manera análoga a WO2010/063378.

El proceso descrito precedentemente se ilustra en el siguiente esquema de síntesis:



a): NaH, ioduro de metilo, THF, temperatura ambiente;

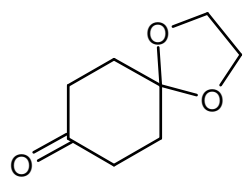
b): ácido toluensulfónico monohidrato, acetona/agua;

c): NaCN, $(NH_4)_2CO_3$, agua/etanol, 60 °C;

d): KOH o NaOH, agua, reflujo;

e): $SOCl_2$, metanol, 40 °C a reflujo.

El compuesto de la fórmula (XIII), en donde R^1 representa un grupo trifluorometilo, se puede preparar por reacción del compuesto de la fórmula (XIV)

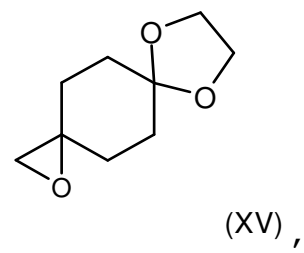


(XIV),

con (trifluorometil)trimetilsilano.

La reacción de la cetona de la fórmula (XIV) con (trifluorometil)trimetilsilano para dar los compuestos de la fórmula (XIII) en general se conduce en solventes inertes, en la presencia de un catalizador, preferiblemente en un rango de temperaturas de entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a presión atmosférica. Los catalizadores son, por ejemplo, carbonatos de metales alcalinos o metales alcalino-térreos tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio o carbonato de cesio. Es asimismo posible emplear fluoruros de metales alcalinos o metales alcalino-térreos tales como fluoruro de litio y fluoruro de cesio, y también sales de fluoruro de bases orgánicas tales como, por ejemplo, fluoruro de tetraetilamonio o fluoruro de tetrabutylamonio para catalizar la reacción deseada. Los solventes inertes son, por ejemplo, éteres tales como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, o carboxamidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida o N-metilpirrolidona, o alquilsulfóxidos tal como dimetilsulfóxido; se prefiere la dimetilformamida. Los derivados sililo de la fórmula (XIII) obtenidos inicialmente son clivados al final utilizando métodos conocidos por el especialista en el arte (véase *Protective Groups in Organic Synthesis*; Theodora W. Greene). El compuesto de la fórmula (XIII), en donde R^1 representa un

grupo metoximetilo, se puede preparar por apertura del epóxido de la fórmula (XV)



mediante procesos conocidos, por ejemplo de manera análoga a Rodriguez, Benjamin; Torre, Maria C. de la; Perales, Aurea; Malakov, Peter Y.; Papanov, Y.; et al., *Tetrahedron*, 1994, Volumen 50, páginas 5451 - 5468.

El epóxido de la fórmula (XV) es conocido y se puede preparar a partir del compuesto de la fórmula (XIV) (Ciaccio, James A.; Drahus, Antoinette L.; Meis, Regina M.; Tingle, Carice T.; Smrtka, Michael; Geneste, Richard, *Synthetic Communications*, 2003, Volumen 33, páginas 2135 - 2144).

Abreviaturas y acrónimos:

DMF	Dimetilformamida
DMSO	dimetil sulfóxido
ELSD	detector de dispersión de luz evaporativa
ESI	ionización por electroatomización (en MS)
h	hora(s)
HPLC	cromatografía líquida de alta presión, de alto rendimiento
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masa
min	minuto(s)
MS	espectrometría de masas

neg	negativo
RMN	espectroscopía de resonancia magnética nuclear
pos	Positivo
RP	fase reversa (en cromatografía)
RT	temperatura ambiente
Rt	tiempo de retención (en HPLC)
ter	terciario
THF	tetrahidrofurano
UPLC	cromatografía líquida de ultra presión

Métodos de LC-MS y HPLC:

Método 1 (UPLC-MS):

Instrumento: Waters Acquity UPLC-MS SQD 3001; columna: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; fase móvil A: agua + ácido fórmico 0,1%, fase móvil B: acetonitrilo; gradiente: 0-1,6 min 1-99% de B, 1,6-2,0 min 99% de B; velocidad de flujo 0,8 ml/min; temperatura: 60 °C; inyección: 2 µl; barrido DAD: 210-400 nM; ELSD.

Método 2 (UPLC-MS):

Instrumento: Waters Acquity UPLC-MS SQD; columna: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; fase móvil A: agua + 0,05% de ácido fórmico, fase móvil B: acetonitrilo + 0,05% de ácido fórmico; gradiente: 0-1,6 min 1-99% de B, 1,6-2,0 min 99% de B; velocidad de flujo 0,8 ml/min; temperatura: 60°C; inyección: 2 µl; barrido DAD: 210-400 nM; ELSD.

Método 3 (UPLC-MS):

Instrumento: Waters Acquity UPLC-MS ZQ4000; columna: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; fase móvil A: agua + 0,05% de

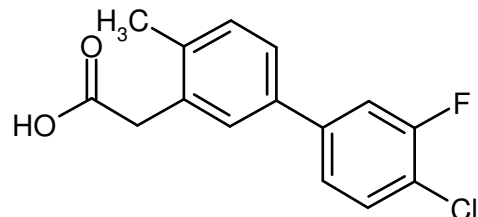
ácido fórmico, fase móvil B: acetonitrilo + 0,05% de ácido fórmico; gradiente: 0-1,6 min 1-99% de B, 1,6-2,0 min 99% de B; velocidad de flujo 0,8 ml/min; temperatura: 60 °C; inyección: 2 µl; barrido DAD: 210-400 nm.

2. Preparación de ejemplos comparativos y ejemplos

Compuestos de partida e intermediarios:

Ejemplo 1A

ácido (4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acético



Bajo argón, se agregaron 33,5 g (192 mmol) de ácido (4-cloro-3-fluorofenil)borónico a una solución de 40,0 g (175 mmol) de ácido (5-bromo-2-metilfenil)acético (EP 1791816 y WO 2006/29799) en una mezcla de 437 ml (437 mmol) de solución acuosa desgasificada de hidróxido de sodio 1N, 160 ml de agua desgasificada y 160 ml de tetrahidrofurano desgasificado. La mezcla se agitó durante 10 minutos, 507 mg (1,75 mmol) de tetrafluoroborato de tri-tert-butilfosfonio y se agregaron 532 mg (1,75 mmol) de acetilacetato de paladio(II) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Luego se agregó tolueno y agua, el pH se ajustó a 1-2 con solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno, la mezcla se agitó durante 10 minutos, las fases se separaron, la fase acuosa se extrajo dos veces con tolueno y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se agitó en 300 ml de una

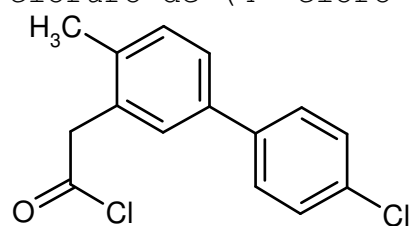
mezcla 6/1 de n-hexano/éter tert-butílico metílico durante 30 minutos, se retiró por filtración con succión, se lavó con n-hexano y se secó bajo presión reducida. Esto dio 38,0 g (78% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 2,27 (s, 3H), 3,67 (s, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,49 – 7,59 (m, 3H), 7,61 – 7,75 (m, 2H), 12,4 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,31 min; MS (ESI $^-$): m/z = 277 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.

Ejemplo 2A

cloruro de (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetilo

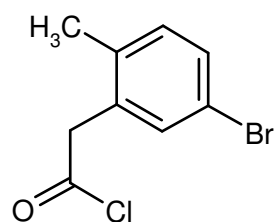


Se disolvieron 5,00 g (19,18 mmol) de ácido (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acético (EP 2029531 A1 y US 2009/298828 A1) en 36,51 g (306,84 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante cuatro horas y luego se concentró bajo presión reducida. El secado bajo vacío medio dio 5,4 g (100% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,36 (s, 3H), 4,22 (s, 2H), 7,29 (d, 1H), 7,35 – 7,55 (m, 6H).

Ejemplo 3A

cloruro de (5-bromo-2-metilfenil)acetilo

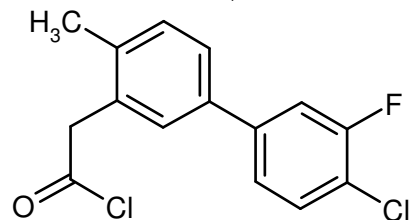


Se disolvieron 6,00 g (26,19 mmol) de ácido (5-bromo-2-metilfenil)acético (EP 1791816 A1 y US 2006/29799 A1) en 31,20 g (261,92 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante dos horas y luego se concentró bajo presión reducida. El secado bajo vacío medio dio 6,29 g (97% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,26 (s, 3H), 4,12 (s, 2H), 7,09 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,37 (dd, 1H).

Ejemplo 4A

cloruro de (4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetilo

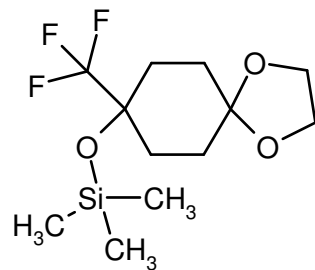


Se disolvieron 10,00 g (35,88 mmol) de ácido (4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acético (Ejemplo 1A) en 24,33 g (204,51 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante una hora y luego se concentró bajo presión reducida. El secado bajo vacío medio dio 10,54 g (99% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,36 (s, 3H), 4,22 (s, 2H), 7,26 - 7,39 (m, 4H), 7,41 - 7,49 (m, 2H).

Ejemplo 5A

Trimetil{[8-(trifluorometil)-1,4-dioxaespiro[4,5]dec-8-il]oxi}silano

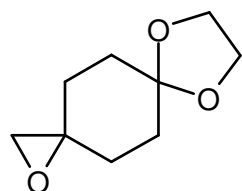


Se disolvieron 5,00 g (32,01 mmol) de 1,4-dioxaespiro[4,5]decan-8-ona en 50 ml de 1,2-dimetoxietano, se agregaron y 14,60 g (44,82 mmol) de carbonato de cesio. A una temperatura interna inferior a 30°C, se agregaron 36,42 g (256,11 mmol) de trimetil(trifluorometil)silano, disueltos en 100 ml de 1,2-dimetoxietano, por goteo a la suspensión resultante, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, se agregaron aproximadamente 600 ml de agua por goteo a la reacción, y la molécula buscada se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó repetidamente con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El secado dio 10,6 g (100% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0,11 (s, 9H), 1,57 - 1,78 (m, 8H), 3,85 (s, 4H).

Ejemplo 6A

1,7,10-Trioxadiespiro[2,2,4,2]dodecano

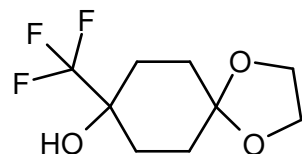


Una solución de 30,0 g (192 mmol) de monoetilenacetal de 1,4-ciclohexanodiona en 750 ml de diclorometano se agregó a una mezcla homogénea de 50,7 g (231 mmol) de ioduro de trimetilsulfoxonio y 25,9 g (231 mmol) de tert-butoxido de potasio, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se agregó hielo-agua, las fases se separaron, la fase acuosa se extrajo repetidamente con diclorometano y las fases orgánicas combinadas se lavaron repetidamente con agua, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 28,3 g (87% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,41 - 1,52 (m, 2H), 1,65 - 1,76 (m, 6H), 2,61 (s, 2H), 3,88 (s, 4H).

Ejemplo 7A

8-(Trifluorometil)-1,4-dioxaespiro[4,5]decan-8-ol



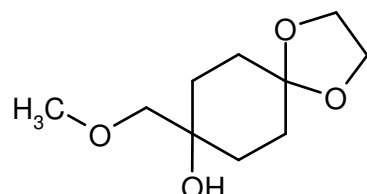
A 0°C, se disolvieron 12,20 g (40,89 mmol) de trimetil{[8-(trifluorometil)-1,4-dioxaespiro[4,5]dec-8-il]oxi}silano (Ejemplo 5A) en 164 ml de solución de fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano 1 molar, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Para el tratamiento posterior, se agregaron aproximadamente 600 ml de agua a la reacción, y la molécula buscada se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó repetidamente con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida.

El secado dio 9,33 g (100% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,49 - 1,58 (m, 2H), 1,59 - 1,77 (m, 6H), 3,83 (s, 4H), 5,78 (s, 1H).

Ejemplo 8A

8-(Metoximetil)-1,4-dioxaespiro[4,5]decan-8-ol

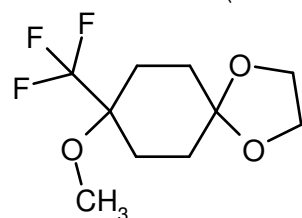


Se agregaron 75 ml de una solución metanólica de metóxido de sodio de 25% de concentración a 4,56 g (26,8 mmol) del compuesto del Ejemplo 6A en 150 ml de metanol, y la mezcla se agitó a 60°C durante la noche. Luego de enfriar, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se colocó en solución acuosa saturada de cloruro de amonio y se extrajo repetidamente con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 3,23 g (60% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,37 - 1,47 (m, 4H), 1,50 - 1,63 (m, 2H), 1,68 - 1,80 (m, 2H), 3,10 (s, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,82 (s, 4H), 4,24 (s, 1H).

Ejemplo 9A

8-Metoxi-8-(trifluorometil)-1,4-dioxaespiro[4,5]decano

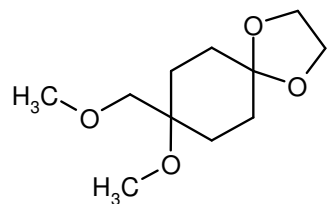


A 0°C, se disolvieron 16,23 g (71,75 mmol) de 8-(trifluorometil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-ol (Ejemplo 7A) en 582 ml de tetrahidrofurano, se agregaron 5,74 g (143,50 mmol) de hidruro de sodio (60% en aceite de parafina) en pequeñas porciones y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregaron 50,92 g (358,76 mmol) de yodometano por goteo a la suspensión resultante, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se volcó sobre aproximadamente 1 l de hielo-agua y el producto se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó repetidamente con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El secado dio 17,34 g (100% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite parduzco.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,50 - 1,75 (m, 6H), 1,85 - 1,98 (m, 2H), 3,30 (s, 3H), 3,84 (s, 4H).

Ejemplo 10A

8-Metoxi-8-(metoximetil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decano



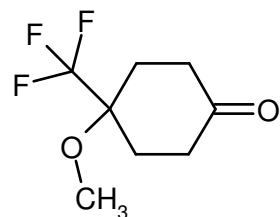
Se disolvieron 3,40 g (16,8 mmol) del compuesto del Ejemplo 8A en 170 ml de tetrahidrofurano, se agregaron 1,01 g (25,2 mmol) de hidruro de sodio (60% en aceite de parafina) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 hora. Luego se agregaron 3,58 g (25,2 mmol) de yodometano, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante

dos horas. Luego se agregaron 3,58 g (25,2 mmol) de yodometano, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. Se agregó agua, la mezcla se extrajo repetidamente con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 3,35 g (92% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,37 - 1,77 (m, 8H), 3,11 (s, 3H), 3,25 (s, 5H), 3,83 (s, 4H).

Ejemplo 11A

4-Metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexanona



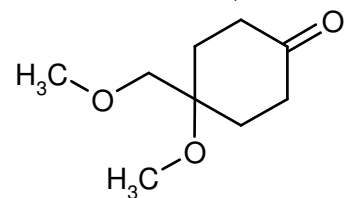
Se disolvieron 11,80 g (49,12 mmol) de 8-metoxi-8-(trifluorometil)-1,4-dioxaespiro[4,5]decano (Ejemplo 9A) en 236 ml de acetona y 118 ml de agua, se agregaron 1,50 g (7,86 mmol) de ácido 4-toluensulfónico monohidrato y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. La mezcla luego se volcó sobre 1,2 l de agua y el producto se extrajo con éter dietílico. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se destiló bajo presión reducida (punto de ebullición: 106-110°C a 40 mbar). Esto dio 6,86 g (71% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite amarillento.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,90 - 2,07 (m, 2H), 2,26

- 2,43 (m, 4H), 2,48 - 2,65 (m, 2H), 3,52 (s, 3H).

Ejemplo 12A

4-Metoxi-4-(metoximetil)ciclohexanona

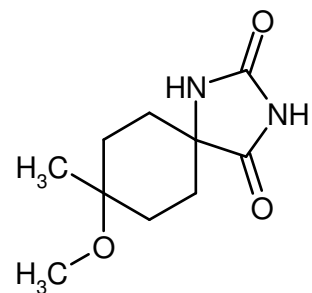


Se disolvieron 13,3 g (61,5 mmol) del compuesto del Ejemplo 10A en 200 ml de acetona y 100 ml de agua, se agregaron 1,87 g (9,84 mmol) de ácido 4-toluensulfónico monohidrato y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. La acetona luego se destiló, el residuo acuoso se neutralizó mediante la adición de bicarbonato de sodio y se agregaron 23,2 g de cloruro de sodio. La mezcla se extrajo repetidamente con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 10,3 g (97% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,61 - 1,76 (m, 2H), 1,97 - 2,12 (m, 4H), 2,34 - 2,46 (m, 2H), 3,22 (s, 3H), 3,28 (s, 3H), 3,36 (s, 2H).

Ejemplo 13A

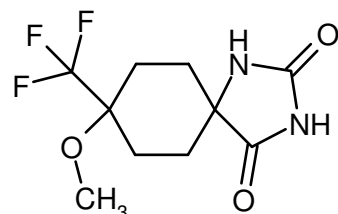
8-Metoxi-8-metil-1,3-diazaespiro[4,5]decano-2,4-diona



Se disolvieron 608 g (6,33 mol) de carbonato de amonio y 68,2 g (1,39 mmol) de cianuro de sodio en 2800 ml de agua. Se agregaron 180 g (1,27 mmol) de 4-metoxi-4-metilciclohexanona (descrita en WO 2010/063378) por goteo a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 60°C durante la noche. El sólido se retiró por filtración con succión y se secó. Esto dio 169,6 g (19% del rendimiento teórico) del compuesto del título como una mezcla de diasterómeros trans/cis 4/1 que se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Ejemplo 14A

8-Metoxi-8-(trifluorometil)-1,3-diazaespiro[4,5]decano-2,4-diona

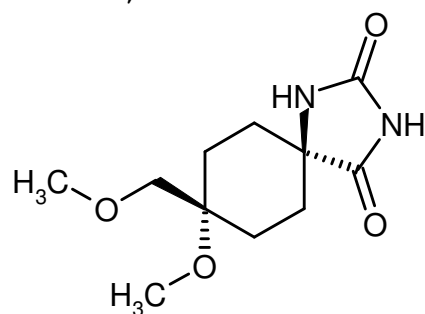


Se suspendieron 8,80 g (44,86 mmol) de 4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexanona (Ejemplo 11A), 4,40 g (89,72 mmol) de cianuro de sodio y 17,24 g (179,44 mmol) de carbonato de amonio en 102 ml de etanol y 102 ml de agua. La suspensión resultante se agitó a 60°C durante 20 horas. El producto precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó bajo presión reducida. Esto dio 10,05 g (84% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un polvo blanco.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,38 - 2,20 (m, 8H), 3,31 (s, 3H), 7,87 (s, 0,25H), 8,70 (s, 0,75H), 10,64 (s, 1H).

Ejemplo 15A

(5r,8r)-8-Metoxi-8-(metoximetil)-1,3-diazaespiro[4,5]decano-2,4-diona

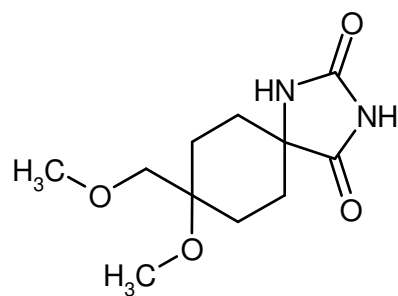


Se disolvieron 28,6 g (298 mmol) de carbonato de amonio y 3,21 g (65,5 mmol) de cianuro de sodio en 130 ml de agua. Se agregaron 10,3 g (59,5 mmol) del compuesto del Ejemplo 12A por goteo a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a 60°C durante la noche. El sólido se retiró por filtración con succión, se lavó con una pequeña cantidad de agua y se secó. Esto dio 8,67 g (60% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,26 - 1,34 (m, 2H), 1,39 - 1,50 (m, 2H), 1,71 - 1,88 (m, 4H), 3,12 (s, 3H), 3,23 (s, 2H), 3,26 (s, 3H), 8,43 (s, 1H), 10,54 (s, 1H).

Ejemplo 16A

8-Metoxi-8-(metoximetil)-1,3-diazaespiro[4,5]decano-2,4-diona

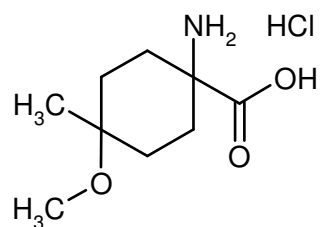


Se disolvieron 5,74 g (59,7 mmol) de carbonato de amonio y

1,46 g (29,8 mmol) de cianuro de sodio en 33 ml de agua. Se agregaron 2,57 g (14,9 mmol) de una solución del compuesto del Ejemplo 12A en 33 ml de etanol por goteo a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a 60°C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a un cuarto de su volumen original y se extrajo repetidamente con diclorometano y acetato de etilo, y las fases orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 675 mg (19% del rendimiento teórico) del compuesto del título como una mezcla diastereomérica que se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Ejemplo 17A

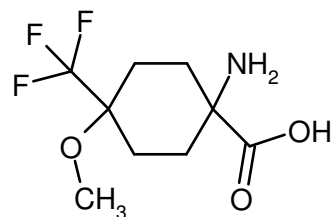
clorhidrato de ácido 1-amino-4-metoxi-4-metilciclohexancarboxílico



Se calentaron 169,5 g del compuesto del Ejemplo 13A en 970 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio de 30% de potencia bajo reflujo durante 20 horas. Luego de enfriar, la mezcla de reacción se ajustó a pH 2 por adición de 670 ml de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno, el precipitado se retiró por filtración con succión y el material filtrado se concentró. Esto dio 110,7 g de un producto crudo como una mezcla de diastereómeros que aún contenía sales y se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Ejemplo 18A

ácido 1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxílico

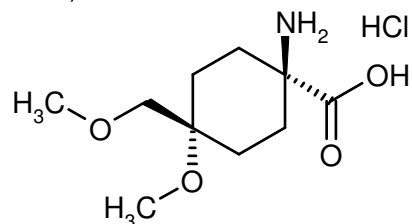


Se suspendieron 10,00 g (37,56 mmol) de 8-metoxi-8-(trifluorometil)-1,3-diazaespiro[4,5]decano-2,4-diona (Ejemplo 14A) en 125 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 3-molar y se agitó bajo condiciones de reflujo durante 3 días. Luego, el pH se ajustó a 6 usando ácido clorhídrico acuoso concentrado, y el producto precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó bajo presión reducida. Esto dio 12,20 g (135% del rendimiento teórico; el producto contenía sales inorgánicas) del compuesto del título como un polvo blanco.

^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4): δ [ppm] = 1,64 – 1,79 (m, 3,6H), 1,89 – 2,08 (m, 2,4H), 2,24 – 2,40 (m, 2H), 3,40 (q, 0,5H), 3,42 (q, 2,5H).

Ejemplo 19A

clorhidrato de ácido trans-1-amino-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxílico



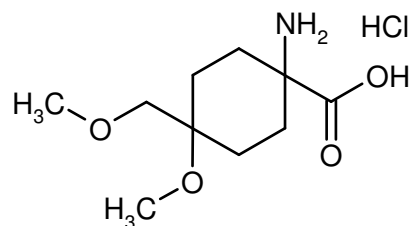
Se calentaron 8,67 g (35,8 mmol) del compuesto del Ejemplo 15A en 52 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio de

30% de potencia bajo reflujo durante 36 horas. Luego de enfriar, la mezcla de reacción se concentró a un cuarto de su volumen original, se ajustó a pH 2 mediante la adición de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno y se evaporó hasta secar. Esto dio 40,4 g de un producto crudo el cual aún contenía sales y se hizo reaccionar sin purificación adicional.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,57 - 1,77 (m, 6H), 1,87 - 2,05 (m, 2H), 3,08 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,27 (s, 2H), 8,50 (s, 3H).

Ejemplo 20A

clorhidrato de ácido 1-amino-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxílico

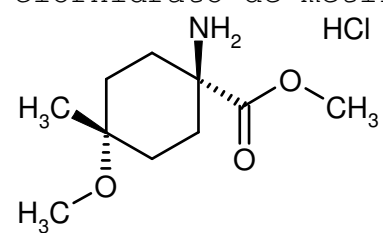


Se calentaron 670 mg del compuesto del Ejemplo 16A en 4 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio de 30% de potencia bajo reflujo durante 18 horas. Luego de enfriar, la mezcla de reacción se concentró a un cuarto de su volumen original, se ajustó a pH 2 mediante la adición de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno y se concentró. Esto dio 4,70 g de un producto crudo como una mezcla de diasterómeros que aún contenía sales y se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Ejemplo 21A

trans-1-amino-4-metoxi-4-metilciclohexancarboxilato de

clorhidrato de metilo

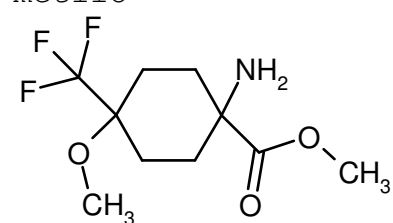


Bajo nitrógeno y a 5°C, se agregaron 172 ml (2,36 mol) de cloruro de tionilo por goteo a 110,5 g del compuesto del Ejemplo 17A en 2500 ml de metanol. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos y a 40°C durante 24 horas. Luego de enfriar, el sólido se retiró por filtración con succión, el material filtrado se concentró, el residuo se agitó en una mezcla de 1000 ml de éter metílico tert-butílico y 300 ml de acetonitrilo durante 10 minutos y el sólido se retiró por filtración con succión. Esto dio 37,1 g (12% del rendimiento teórico desde 4-metoxi-4-metilciclohexanona del Ejemplo 13A) del compuesto del título el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,08 (s, 3H), 1,60 - 1,79 (m, 6H), 1,94 - 2,11 (m, 2H), 3,07 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 8,68 (s, 3H).

Ejemplo 22A

1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo



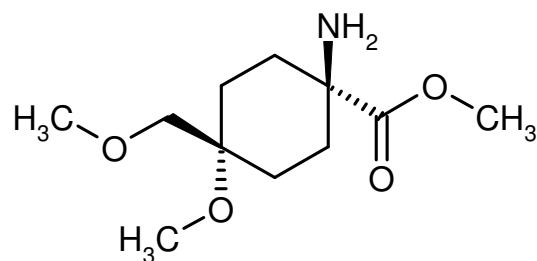
Se suspendieron 12,20 g (corresponde a aproximadamente 37,58

mmol) de ácido 1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxílico (Ejemplo 18A) en 210 ml de metanol, y se agregaron 10,4 ml (142,80 mmol) de cloruro de tionilo a 0°C. La mezcla se llevó a ebullición bajo reflujo durante 2 horas y se enfrió, se agregaron otros 10,4 ml (142,80 mmol) de cloruro de tionilo a 0°C y la mezcla se llevó a ebullición bajo reflujo durante otras 2 horas. La reacción se enfrió, se agregaron otros 10,4 ml (142,80 mmol) de cloruro de tionilo y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche hasta haberse completado la reacción. Para el tratamiento posterior, se destilaron aproximadamente 100 ml de metanol y el concentrado se volcó sobre 1 l de solución acuosa saturada de carbonato de sodio. El producto se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio. La concentración mediante evaporación dio 7,01 g (73% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un aceite amarillento.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,39 - 2,00 (m, 10H), 3,28 (q, 3H), 3,59 (s, 2,4H), 3,60 (s, 0,6H).

Ejemplo 23A

trans-1-amino-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo



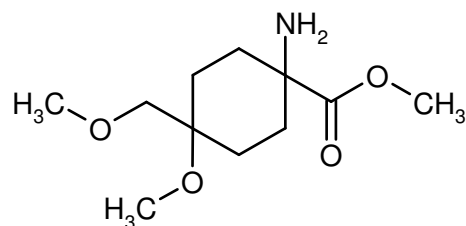
A 0°C, se agregaron 34,8 ml (478 mmol) de cloruro de tionilo

por goteo a 40,4 g del compuesto del Ejemplo 19A en 400 ml de metanol. La mezcla se agitó a 0°C durante 0,5 horas y a 40°C durante 24 horas. Luego de enfriar, la mezcla se concentró, el residuo se colocó en acetato de etilo y se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, la fase acuosa se extrajo repetidamente con acetato de etilo y diclorometano y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 7,16 g (87% del rendimiento teórico del Ejemplo 15A) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,27 - 1,35 (m, 2H), 1,46 - 1,55 (m, 2H), 1,58 - 1,72 (m, 4H), 1,74 - 1,84 (m, 2H), 3,09 (s, 3H), 3,23 (s, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,60 (s, 3H).

Ejemplo 24A

1-amino-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo

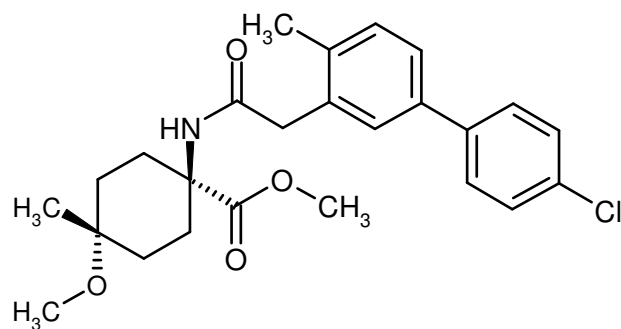


A 0°C, se agregaron 4,1 ml (55,60 mmol) de cloruro de tionilo por goteo a 4,70 g del compuesto del Ejemplo 20A en 50 ml de metanol. La mezcla se agitó a 0°C durante 0,5 horas y a 40°C durante la noche. Luego de enfriar, la mezcla se concentró, el residuo se colocó en acetato de etilo y se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, la fase acuosa se extrajo repetidamente con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se

filtró y se concentró. Esto dio 392 mg (61% del rendimiento teórico del Ejemplo 16A) del compuesto del título como una mezcla diasteromérica que se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Ejemplo 25A

trans-1-{[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-metoxi-4-metilciclohexancarboxilato de metilo



Se disolvieron 8,08 g (31,0 mmol) de ácido (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acético (EP 2029531 A1 y US 2009/298828 A1) en 12,9 ml (428 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 1 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en 70 ml de acetonitrilo. Se agregó acetato de etilo y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio a 6,00 g (25,2 mmol) del compuesto del Ejemplo 21A. Las fases se separaron, la fase acuosa se extrajo repetidamente con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Se agregaron 120 ml de acetonitrilo y 12,2 g (88,3 mmol) de carbonato de potasio al residuo. Con enfriamiento con hielo, la solución del cloruro de ácido se agregó por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en agua y se

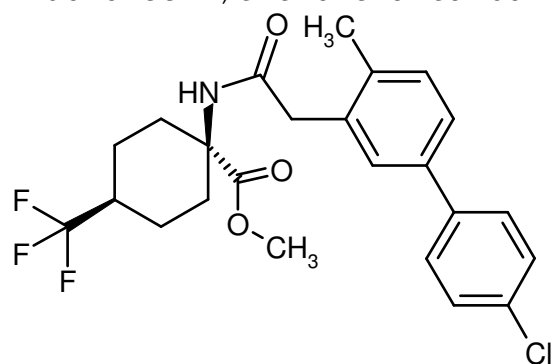
extrajo repetidamente con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron repetidamente con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). Esto dio 7,87 g (68% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0,98 (s, 3H), 1,34 – 1,46 (m, 2H), 1,54 – 1,64 (m, 2H), 1,74 – 1,87 (m, 4H), 2,28 (s, 3H), 3,04 (s, 3H), 3,51 (s, 3H), 3,58 (s, 2H), 7,23 (d, 1H), 7,43 (dd, 1H), 7,47 – 7,53 (m, 2H), 7,55 (d, 1H), 7,61 – 7,68 (m, 2H), 8,23 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): R_t = 1,41 min; MS (ESIpos): m/z = 444 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 26A

cis-1-{[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo



A temperatura ambiente, se disolvieron 5,00 g (19,09 mmol) de clorhidrato de cis-1-amino-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (EP 1220841 A2 y WO 2001/23354 A3), 4,83 g (47,73 mmol) de trietilamina y 117 mg (0,955 mmol) de

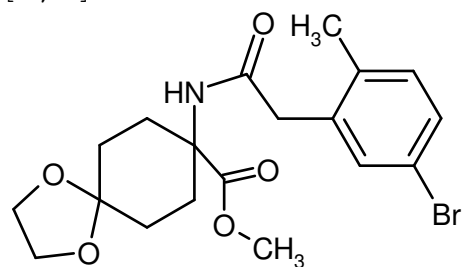
N,N-dimetilaminopiridina en 40 ml de diclorometano. Luego se agregó una solución de 5,33 g (19,09 mmol) de cloruro de (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetilo (Ejemplo 2A) en 40 ml de diclorometano por goteo a la mezcla. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con ácido cítrico acuoso de 5% de potencia. Después de secar sobre sulfato de sodio, la mezcla se concentró mediante evaporación y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). La concentración y el secado dieron 6,36 g (71% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,35 - 1,80 (m, 6H), 2,05 - 2,18 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,25 - 2,40 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 7,19 (d, 1H), 7,40 (dd, 1H), 7,42 - 7,52 (m, 3H), 7,56 - 7,65 (m, 2H), 8,34 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,50 min; MS (ESIpos): m/z = 468 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 27A

8-{[(5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino}-1,4-dioxaspiro-[4,5]decano-8-carboxilato de metilo

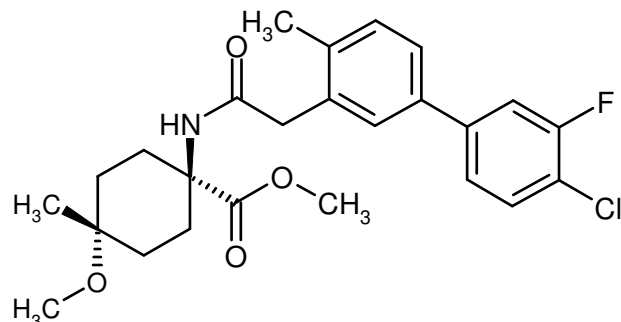


A temperatura ambiente, se disolvieron 5,47 g (25,41 mmol)

de 8-amino-1,4-dioxaspiro[4,5]decano-8-carboxilato de metilo [T. Satoh et al., Tetrahedron **63** (2007), 4806 - 4813], 3,86 g (38,12 mmol) de trietilamina y 155 mg (1,27 mmol) de N,N-dimetilaminopiridina en 45 ml de diclorometano. Luego se agregó una solución de 6,29 g (25,41 mmol) de cloruro de (5-bromo-2-metilfenil)acetilo (Ejemplo 3A) en 45 ml de diclorometano por goteo a la mezcla. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Después de secar sobre sulfato de sodio, la mezcla se concentró mediante evaporación y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo/1% trietilamina). La evaporación y el secado dieron 3,64 g (34% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se usó sin caracterización adicional en el siguiente paso.

Ejemplo 28A

trans-1-{[(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetil]-amino}-4-metoxi-4-metilciclohexancarboxilato de metilo



Se disolvieron 20,9 g (75,0 mmol) del compuesto del Ejemplo 1A en 31,2 ml (428 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de

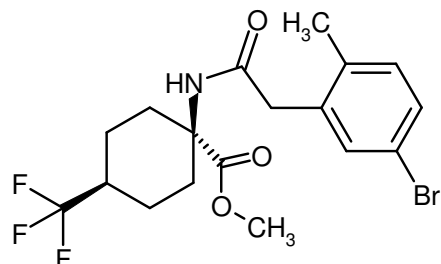
reacción se agitó a 80°C durante 1 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en 200 ml de acetonitrilo. Se agregó acetato de etilo y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio a 16,0 g (67,3 mmol) del compuesto del Ejemplo 21A. Las fases se separaron, la fase acuosa se extrajo repetidamente con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Se agregaron 250 ml de acetonitrilo y 28,5 g (206 mmol) de carbonato de potasio al residuo. Con enfriamiento con hielo, la solución del cloruro de ácido se agregó por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en agua y se extrajo repetidamente con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron repetidamente con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Para purificarse adicionalmente, el residuo se recogió nuevamente en diclorometano, se lavó repetidamente con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 23,6 g (76% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 0,98 (s, 3H), 1,32 - 1,45 (m, 2H), 1,55 - 1,63 (m, 2H), 1,74 - 1,86 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 3,04 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 3,58 (s, 2H), 7,24 (d, 1H), 7,46 - 7,55 (m, 2H), 7,59 - 7,73 (m, 3H), 8,23 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,46$ min; MS (ESIpos): $m/z = 462$
 $[M+H]^+$.

Ejemplo 29A

cis-1-{[(5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino}-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo

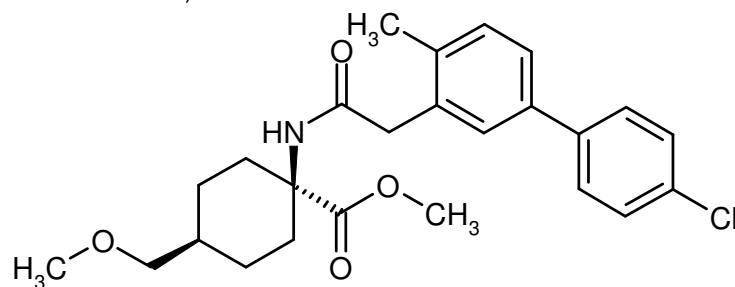


A temperatura ambiente, se disolvieron 10,00 g (38,22 mmol) de clorhidrato de cis-1-amino-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (EP 1220841 A2 y WO 2001/23354 A3), 9,67 g (95,54 mmol) de trietilamina y 233 mg (1,91 mmol) de N,N-dimetilaminopiridina en 95 ml de diclorometano. Luego se agregó una solución de 9,46 g (38,22 mmol) de cloruro de (5-bromo-2-metilfenil)acetilo (Ejemplo 3A) en 95 ml de diclorometano por goteo a la mezcla. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y con ácido cítrico acuoso de 5% de potencia. Después de secar sobre sulfato de sodio, la mezcla se concentró mediante evaporación y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de diclorometano/metanol). La evaporación y el secado dieron 8,84 g (53% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se usó sin caracterización adicional en

el siguiente paso.

Ejemplo 30A

cis-1-{[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo



Se disolvieron 28,3 g (119 mmol) de clorhidrato de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo (descrito en WO 2007/048545) en 100 ml de agua, se agregaron 20,0 g (238 mmol) de bicarbonato de sodio y la mezcla se extrajo repetidamente con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Esto dio 9,88 g de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo. Se agregaron 7,46 g (54,0 mmol) de carbonato de potasio a 5,93 g (29,4 mmol) de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo en 50 ml de acetonitrilo. Con enfriamiento con hielo, se agregó una solución de 6,85 g (24,5 mmol) del compuesto del Ejemplo 2A en 50 ml de acetonitrilo por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante un día. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en agua y se extrajo con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Esto dio 10,5 g

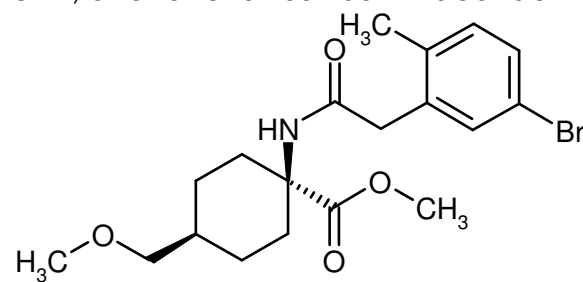
del compuesto del título el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,05 – 1,25 (m, 2H), 1,44 – 1,65 (m, 5H), 2,01 – 2,12 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 3,04 (d, 2H), 3,17 (s, 3H), 3,51 (s, 3H), 3,58 (s, 2H), 7,23 (d, 1H), 7,43 (dd, 1H), 7,47 – 7,57 (m, 3H), 7,62 – 7,68 (m, 2H), 8,21 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,43 min; MS (ESIpos): m/z = 444 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 31A

cis-1-[(5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino}-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo



Se disolvieron 55,3 g (232 mmol) de clorhidrato de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo (descrito en WO 2007/048545, página 144) en 200 ml de agua, se agregaron 39,0 g (465 mmol) de bicarbonato de sodio y la mezcla se extrajo repetidamente con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Esto dio 17,2 g de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo. Se disolvieron 1,90 g (8,30 mmol) de ácido (5-bromo-2-metilfenil)acético (descrito en EP 1791816 y WO 2006/29799) en 3,5 ml (47,3 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción

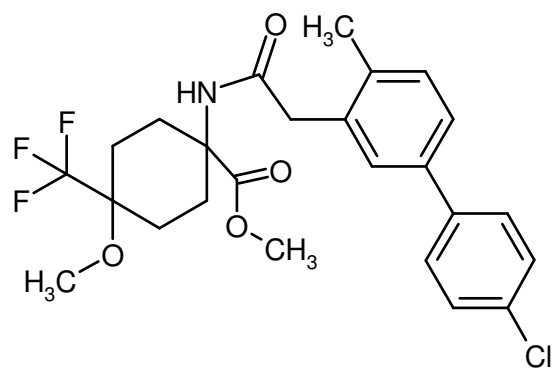
se agitó a 80°C durante 1 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en 15 ml de acetonitrilo. Se agregaron 2,52 g (18,2 mmol) de carbonato de potasio a 2,00 g (9,94 mmol) de cis-1-amino-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo en 20 ml de acetonitrilo. Con enfriamiento con hielo, la solución del cloruro de ácido se agregó por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en agua y se extrajo con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Esto dio 3,11 g (91% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,07 - 1,29 (m, 2H), 1,47 - 1,66 (m, 5H), 2,01 - 2,12 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 3,13 (d, 2H), 3,22 (s, 3H), 3,51 (s, 2H), 3,54 (s, 3H), 7,10 (d, 1H), 7,30 (dd, 1H), 7,41 (d, 1H), 8,22 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): Rt = 1,25 min; MS (ESIpos): m/z = 412 [M+H]⁺.

Ejemplo 32A

1-{[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo

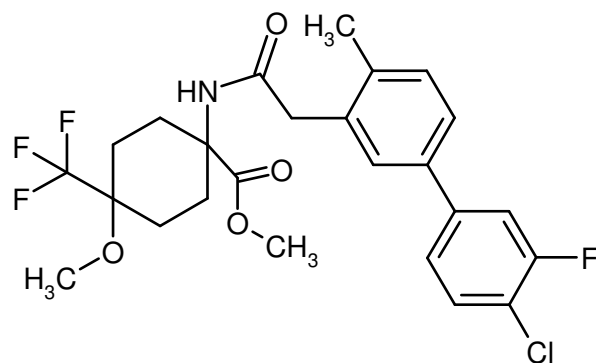


Se disolvieron 3,94 g (15,44 mmol) de 1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 22A) y 1,56 g (15,44 mmol) de trietilamina en 56 ml de diclorometano. Se agregaron 3,92 g (14,03 mmol) de cloruro de (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetilo (Ejemplo 2A), disueltos en 56 ml de diclorometano, por goteo a esta solución, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y con ácido cítrico acuoso de 1% de potencia. Después de secar sobre sulfato de sodio, la fase orgánica se concentró y el producto se secó. Esto dio 6,81 g (97% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un polvo blanco.

LC-MS (Método 1): Rt = 1,51 min; MS (ESIpos): m/z = 498 [M+H]⁺.

Ejemplo 33A

1-{[(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo

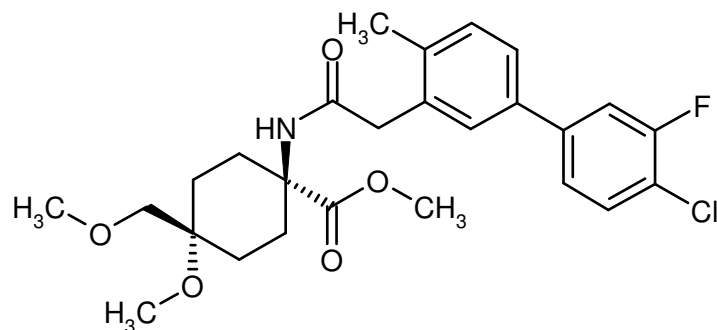


Se disolvieron 20,50 g (80,32 mmol) de 1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 22A) y 8,13 g (80,32 mmol) de trietilamina en 280 ml de diclorometano. Se agregaron 21,70 g (73,02 mmol) de cloruro de (4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetilo (Ejemplo 4AA), disueltos en 280 ml de diclorometano, por goteo a esta solución, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y con ácido cítrico acuoso de 1% de potencia. Después de secar sobre sulfato de sodio, la fase orgánica se concentró y el producto se secó. Esto dio 37,05 g (98% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un polvo color beige.

LC-MS (Método 1): $R_t = 1,51$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ $[M+H]^+$.

Ejemplo 34A

trans-1-([(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetil]-amino)-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo



Se disolvieron 4,48 g (16,1 mmol) del compuesto del Ejemplo 1A en 5,6 ml (76,4 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 1 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en 20 ml de acetonitrilo. Se agregaron 6,48 g (46,9 mmol) de carbonato de potasio a 3,10 g (13,4 mmol) del compuesto del Ejemplo 23A en 30 ml de acetonitrilo. Con enfriamiento con hielo, la solución del cloruro de ácido se agregó por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla luego se agregó a hielo-agua y se extrajo repetidamente con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron repetidamente con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 6,59 g (96% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional.

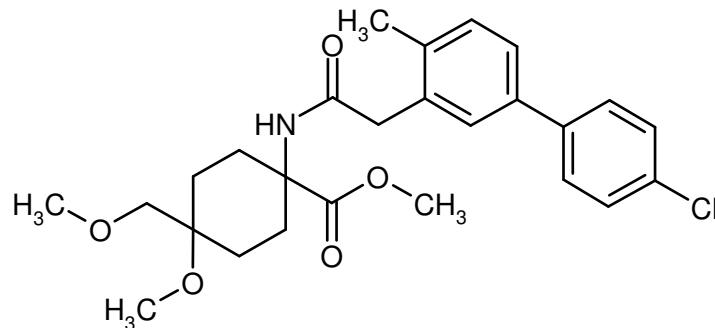
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,32 – 1,49 (m, 2H), 1,54 – 1,66 (m, 2H), 1,70 – 1,91 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 3,09 (s, 3H), 3,14 (s, 2H), 3,20 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 3,57 (s, 2H), 7,24 (d, 1H), 7,46 – 7,56 (m, 2H), 7,58 – 7,74 (m, 3H), 8,27 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): R_t = 1,38 min; MS (ESIpos): m/z = 492

[M+H]⁺.

Ejemplo 35A

1-[[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino]-4-metoxi-4-(metoximetil)ciclohexancarboxilato de metilo

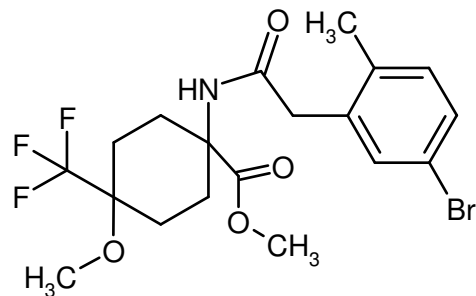


Se disolvieron 574 mg (2,20 mmol) de ácido (4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acético (EP 2029531 A1 y US 2009/298828 A1) en 0,9 g (12,5 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 1 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en 5 ml de acetonitrilo. Se agregaron 816 mg (5,90 mmol) de carbonato de potasio a 390 mg (1,69 mmol) del compuesto del Ejemplo 24A en 10 ml de acetonitrilo. Con enfriamiento con hielo, la solución del cloruro de ácido se agregó por goteo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en hielo-agua y se extrajo repetidamente con diclorometano, y las fases orgánicas combinadas se lavaron repetidamente con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Esto dio 570 mg del compuesto del título como una mezcla diastereomérica que se hizo reaccionar sin purificación adicional. LC-MS (Método 2): Rt = 1,36 min; MS (ESIpos): m/z = 474

[M+H]⁺.

Ejemplo 36A

1-[[(5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino]-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo

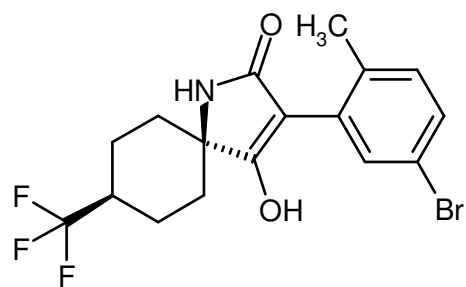


Se disolvieron 3,00 g (11,75 mmol) de 1-amino-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 22A) y 1,19 g (11,75 mmol) de trietilamina en 40 ml de diclorometano. Se agregaron 2,65 g (10,69 mmol) de cloruro de (5-bromo-2-metilfenil)acetilo (Ejemplo 3A), disueltos en 40 ml de diclorometano, por goteo a esta solución, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para el tratamiento posterior, la mezcla se diluyó con diclorometano y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y con ácido cítrico acuoso de 1% de potencia. Después de secar sobre sulfato de sodio, la fase orgánica se concentró y el producto se secó. Esto dio 4,79 g (87% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un polvo color beige.

LC-MS (Método 1): Rt = 1,33 min; MS (ESIpos): m/z = 468 [M+H]⁺.

Ejemplo 37A

(5s,8s)-3-(5-Bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



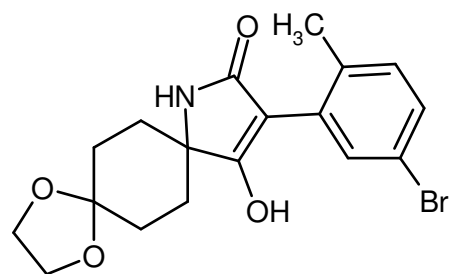
Se agregaron 4,53 g (40,34 mmol) de tert-butóxido de potasio a 8,80 g (20,17 mmol) de cis-1-[[[5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino]-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 29A) en 100 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó sobre 800 ml de hielo-agua y se acidificó con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). El secado dio 5,23 g (64% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,40 - 1,50 (m, 2H), 1,58 - 1,72 (m, 2H), 1,77 - 1,86 (m, 2H), 1,86 - 1,96 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,12 - 2,28 (m, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,19 (d, 1H), 7,33 (dd, 1H), 8,33 (s, 1H), 11,01 (s, 1H).

LC-MS (Método 3): R_t = 1,18 min; MS (ESIpos): m/z = 406 [M+H] $^+$.

Ejemplo 38A

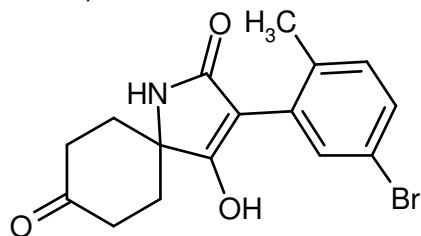
11-(5-Bromo-2-metilfenil)-12-hidroxipiro[4,2,4,2]tetradec-11-en-10-ona



Se agregaron 1,92 g (17,08 mmol) de tert-butóxido de potasio a 3,64 g (8,54 mmol) de 8-[[5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino}-1,4-dioxaespiro[4,5]decano-8-carboxilato de metilo (Ejemplo 27A) en 43 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 30 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó sobre 500 ml de hielo-agua y se acidificó a pH = 4 con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración. El secado dio 2,49 g (74% del rendimiento teórico) del compuesto del título el cual se usó sin caracterización adicional en el siguiente paso.

Ejemplo 39A

3-(5-Bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2,8-diona



Se agregaron 192 mg (1,01 mmol) de ácido 4-toluensulfónico monohidrato a 2,49 g (6,32 mmol) de 11-(5-bromo-2-metilfenil)-12-hidroxi-1,4-dioxa-9-azadiespiro[4,2,4,2]tetradec-11-en-10-ona (Ejemplo 38A) en 26 ml de acetona y 13 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante la noche.

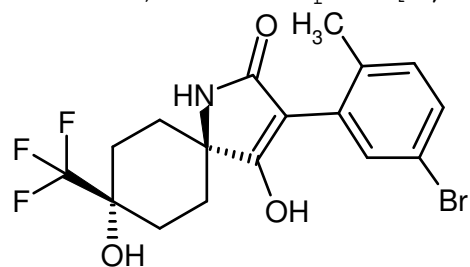
Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se diluyó con agua y la acetona se retiró en un evaporador rotativo. El producto precipitado crudo se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El secado dio 1,97 g (89% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,68 - 1,78 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,21 - 2,34 (m, 4H), 2,64 - 2,78 (m, 2H), 7,15 (d, 1H), 7,23 (d, 1H), 7,35 (dd, 1H), 8,53 (s, 1H), 11,12 (s, 1H).

LC-MS (Método 3): R_t = 0,87 min; MS (ESIpos): m/z = 352 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 40A

(5r,8r)-3-(5-Bromo-2-metilfenil)-4,8-dihidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Se agregaron 521 mg (1,60 mmol) de carbonato de cesio y 975 mg (6,85 mmol) de (trifluorometil)trimetilsilano a 400 mg (1,14 mmol) de 3-(5-bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2,8-diona (Ejemplo 39A) en 8,3 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante tres horas. Luego, la mezcla se diluyó con agua, se acidificó a pH = 4,5 con ácido cítrico acuoso y

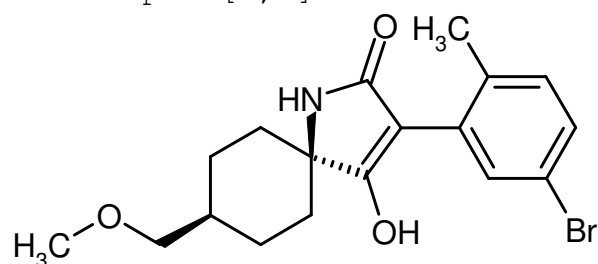
se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de tetrahidrofurano, se agregó 1 ml de ácido clorhídrico acuoso 4N y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se diluyó con agua. El producto crudo se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio. Después de la concentración bajo presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). La evaporación y el secado dieron 367 mg (76% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4): δ [ppm] = 1,39 – 1,50 (m, 2H), 1,84 – 1,98 (m, 4H), 2,15 (s, 3H), 2,30 – 2,43 (m, 2H), 7,15 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,34 (dd, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 0,96 min; MS (ESIpos): m/z = 420 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 41A

(5s,8s)-3-(5-Bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Se agregaron 1,69 g (15,1 mmol) de tert-butoxido de potasio a 3,11 g (7,54 mmol) del compuesto del Ejemplo 31A en 11 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se calentó a

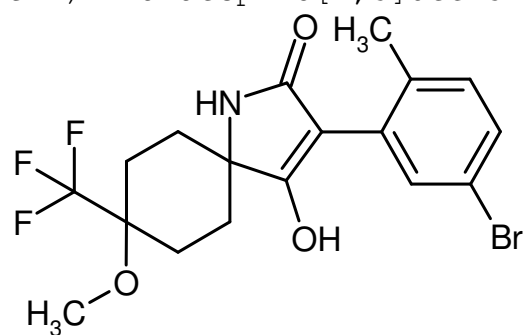
80°C durante 15 minutos. Luego de enfriar, la mezcla se concentró, el residuo se colocó en agua, se agregó solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N por goteo y la mezcla se agitó durante 0,5 h. El precipitado se retiró por filtración con succión, se lavó con agua y se secó. Esto dio 2,83 g (96% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,22 – 1,44 (m, 4H), 1,46 – 1,63 (m, 1H), 1,65 – 1,75 (m, 2H), 1,80 – 1,85 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 3,15 (d, 2H), 3,23 (s, 3H), 7,17 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,36 (dd, 1H), 8,16 (s, 1H), 10,89 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,05 min; MS (ESIpos): m/z = 380 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 42A

3-(5-Bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Se agregaron 2,26 g (20,16 mmol) de tert-butoxido de potasio a 4,70 g (10,08 mmol) de 1-[[5-bromo-2-metilfenil)acetil]amino}-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 36A) en 50 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó

sobre 800 ml de hielo-agua y se acidificó con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración y se secó. Esto dio 3,68 g (84% del rendimiento teórico) del compuesto del título como un polvo color beige.

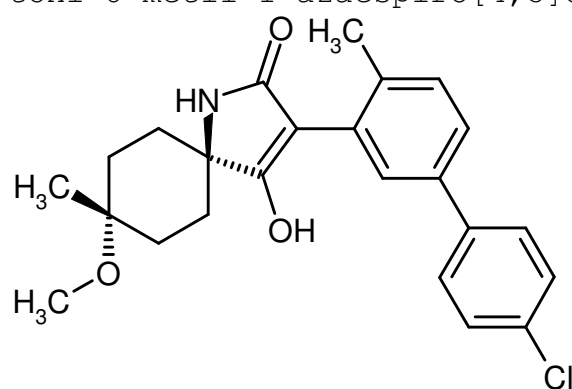
^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4): δ [ppm] = 1,39 - 2,45 (m, 11H), 3,42 - 3,46 (m, 3H), 7,12 - 7,18 (m, 1H), 7,25 - 7,29 (m, 1H), 7,32 - 7,38 (m, 1H).

Ejemplos comparativos:

para el Ejemplo 1-1

V.1-a (= compuesto de la Tabla 1, fila 20, p. 40 de WO10/063378)

(5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-metil-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo nitrógeno, se agregaron 2,18 g (19,4 mmol) de tert-butóxido de potasio a 7,83 g (17,6 mmol) del compuesto del Ejemplo 25A en 75 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en hielo-agua y se acidificó con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N, la mezcla se agitó durante 30 minutos y se retiró por filtración con succión y el precipitado se lavó con agua

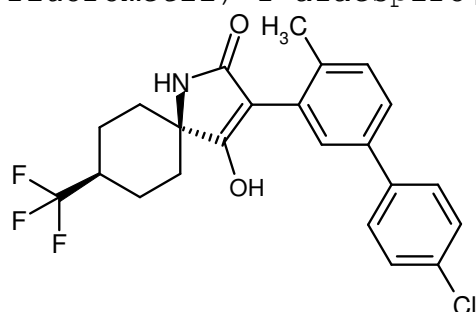
y se secó. Para purificarse adicionalmente, el producto se disolvió en solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, la mezcla se filtró, y el producto se precipitó por acidificación con ácido clorhídrico acuoso 1 N, se lavó con agua, se retiró por filtración y se secó. Esto dio 4,78 g (65% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,09 (s, 3H), 1,12 - 1,20 (m, 2H), 1,60 - 1,71 (m, 2H), 1,71 - 1,80 (m, 2H), 2,04 - 2,14 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 3,10 (s, 3H), 7,30 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,46 - 7,52 (m, 3H), 7,62 - 7,68 (m, 2H), 8,15 (s, 1H), 10,79 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): R_t = 1,23 min; MS (ESIpos): m/z = 412 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

V.1-b

(5s,8s)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona

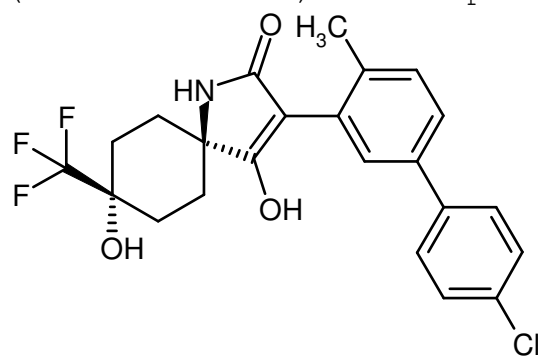


Se agregaron 3,05 g (27,18 mmol) de tert-butóxido de potasio a 6,36 g (13,59 mmol) de cis-1-{[(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 26A) en 68 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó

sobre 800 ml de hielo-agua y se acidificó con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración, se secó y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de hexano/acetato de etilo). La evaporación dio 4,1 g (69% del rendimiento teórico) del compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,40 - 1,55 (m, 2H), 1,58 - 1,77 (m, 2H), 1,78 - 2,02 (m, 4H), 2,15 (s, 3H), 2,17 - 2,30 (m, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,42 - 7,51 (m, 3H), 7,58 - 7,66 (m, 2H), 8,29 (s, 1H), 10,90 (s, 1H). LC-MS (Método 1): R_t = 1,32 min; MS (ESIpos): m/z = 436 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

V.1-c

(5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4,8-dihidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo argón, se agregaron 24 mg (0,030 mmol) de complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]paladio/diclorometano a 125 mg (0,30 mmol) de (5r,8r)-3-(5-bromo-2-metilfenil)-4,8-dihidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona (Ejemplo 40A) en 13 ml de 1,2-dimetoxietano desgasificado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se agregaron 70 mg (0,45 mmol) de ácido (4-clorofenil)borónico y una solución de 339 mg (1,04 mmol)

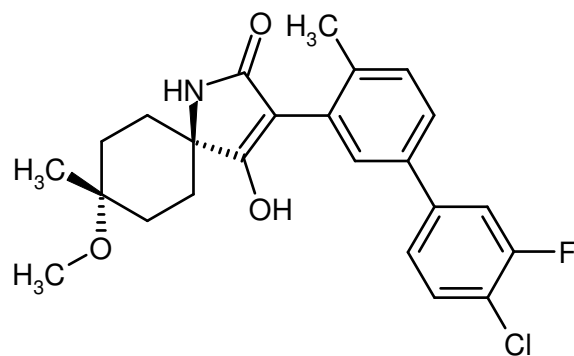
de carbonato de cesio en 815 µl de agua desgasificada. La mezcla de reacción se calentó en un recipiente cerrado bajo radiación de microondas a 150°C durante 10 minutos. Luego de enfriar, se agregaron 100 µl de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno a la reacción, y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se colocó en diclorometano y se lavó con ácido cítrico acuoso de 5% de potencia (pH = 4,0 - 4,5) y agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró mediante evaporación. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo) y mediante HPLC cromatografía (fase C18, fase móvil: gradiente de agua/acetonitrilo/ácido fórmico 0,1%), dando 17,4 mg (13% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

¹H RMN (400 MHz, metanol-d₄): □ [ppm] = 1,41 - 1,53 (m, 2H), 1,85 - 2,01 (m, 4H), 2,24 (s, 3H), 2,33 - 2,46 (m, 2H), 7,32 (d, 1H), 7,35 - 7,42 (m, 3H), 7,46 (dd, 1H), 7,58 ("d", 2H).
LC-MS (Método 1): Rt = 1,19 min; MS (ESIpos): m/z = 452 [M+H]⁺.

para el Ejemplo de Trabajo 1-2

V.2-a (= compuesto de la Tabla 2, fila 10, p. 45 de WO10/063378)

(5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-metil-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



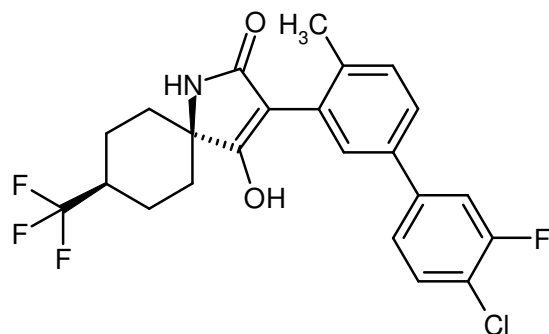
Bajo nitrógeno, se agregaron 6,22 g (55,4 mmol) de tert-butóxido de potasio a 23,5 g (50,4 mmol) del compuesto del Ejemplo 28A en 250 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en agua y se acidificó con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N, la mezcla se agitó durante 30 minutos y se retiró por filtración con succión y el precipitado se lavó con agua y se secó. Esto dio 21,4 g (aproximadamente 90% de pureza, 89% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,08 (s, 3H), 1,10 – 1,22 (m, 2H), 1,56 – 1,81 (m, 4H), 1,99 – 2,14 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 3,10 (s, 3H), 7,29 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,46 – 7,56 (m, 2H), 7,60 – 7,72 (m, 2H), 8,05 (s, 1H), 10,86 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,25 min; MS (ESIpos): m/z = 430 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

V.2-b

(5s,8s)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo argón, se agregaron 1,01 g (1,24 mmol) de complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]paladio/diclorometano a 5,00 g (12,4 mmol) del compuesto del Ejemplo 37A en 500 ml de 1,2-dimetoxietano desgasificado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y 3,24 g (18,5 mmol) de ácido (4-cloro-3-fluorofenil)borónico y luego se agregó una solución de 14,1 g (43,3 mmol) de carbonato de cesio en 30 ml de agua desgasificada. La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 2 h. Luego de enfriar, se agregaron 10 ml de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno, la fase acuosa se separó, se agregó sulfato de magnesio, la mezcla se filtró a través de gel de sílice, la almohadilla de filtrado se lavó con acetato de etilo y la mezcla se concentró. La purificación del producto crudo mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo) y la cristalización desde acetato de etilo dieron 2,48 g (44% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

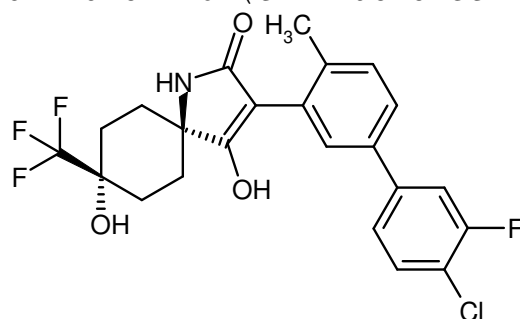
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,45 - 1,57 (m, 2H), 1,62 - 1,79 (m, 2H), 1,81 - 2,05 (m, 4H), 2,19 (s, 3H), 2,20 - 2,33 (m, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,49 - 7,58 (m, 2H), 7,64 (t, 1H), 7,70 (dd, 1H), 8,33 (s, 1H), 10,95 (s,

¹H).

LC-MS (Método 1): Rt = 1,34 min; MS (ESIpos): m/z = 454
[M+H]⁺.

V.2-c

(5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4,8-dihidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo argón, se agregaron 24 mg (0,030 mmol) de complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]paladio/diclorometano a 125 mg (0,30 mmol) de (5r,8r)-3-(5-bromo-2-metilfenil)-4,8-dihidroxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona (Ejemplo 40A) en 13 ml de 1,2-dimetoxietano desgasificado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se agregó 78 mg (0,45 mmol) de ácido (4-cloro-3-fluorofenil)borónico y una solución de 340 mg (1,04 mmol) de carbonato de cesio en 815 µl de agua desgasificada. La mezcla de reacción se calentó en un recipiente cerrado bajo radiación de microondas a 150°C durante 10 minutos. Luego de enfriar, 100 µl de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno se agregaron a la reacción, y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se colocó en diclorometano y se lavó con ácido cítrico acuoso de 5% de potencia (pH = 4,0 - 4,5) y agua. La fase orgánica se secó

sobre sulfato de sodio y se concentró mediante evaporación. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo), dando 68 mg (49% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (300 MHz, metanol- d_4): δ [ppm] = 1,41 - 1,56 (m, 2H), 1,85 - 1,99 (m, 4H), 2,25 (s, 3H), 2,32 - 2,48 (m, 2H), 7,10 - 7,25 (m, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,40 (dd, 1H), 7,43 - 7,56 (m, 3H).

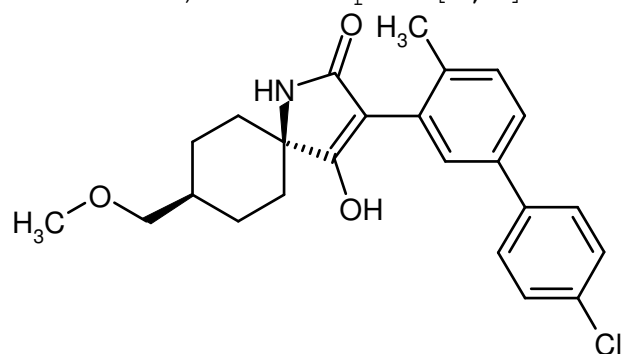
LC-MS (Método 1): R_t = 1,19 min; MS (ESIpos): m/z = 470 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

para el Ejemplo de Trabajo 1-3

V.3-a (=V.1-a) = compuesto de la Tabla 1, fila 20, p. 40 de WO10/063378

V.3-b

(5s,8s)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Se agregaron 5,26 g (46,9 mmol) de tert-butóxido de potasio a 10,4 g (23,4 mmol) del compuesto del Ejemplo 30A en 35 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 15 minutos. Luego de enfriar, la mezcla se concentró, el residuo se colocó en agua y la solución se agregó

por goteo a solución acuosa de cloruro de hidrógeno 2N. El precipitado se retiró por filtración con succión, se lavó con agua y se secó. Esto dio 9,3 g del compuesto del título. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,21 - 1,47 (m, 4H), 1,48 - 1,64 (m, 1H), 1,65 - 1,78 (m, 2H), 1,81 - 1,97 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 3,16 (d, 2H), 3,24 (s, 3H), 7,30 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,44 - 7,53 (m, 3H), 7,61 - 7,68 (m, 2H), 8,13 (s, 1H), 10,77 (s, 1H).

LC-MS (Método 3): R_t = 1,25 min; MS (ESIpos): m/z = 412 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

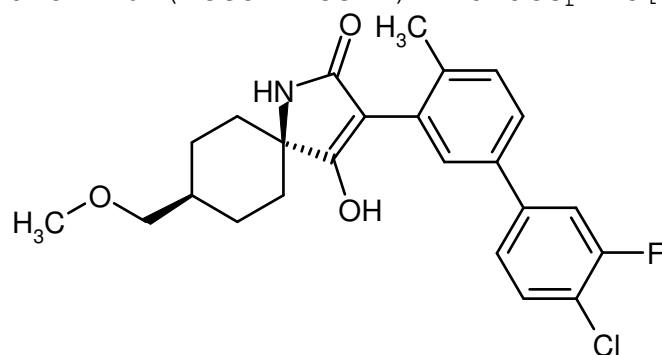
La sustancia se describió como una mezcla isomérica como Ejemplo I-1-a-5 de WO 07/048545.

para el Ejemplo de Trabajo 1-4

V.4-a (=V.2-a) = compuesto de la Tabla 2, fila 10, p. 45 de WO10/063378)

V.4-b

(5s,8s)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo argón, se agregó 1,10 g (6,31 mmol) de ácido (4-cloro-3-fluorofenil)borónico y una solución de 6,00 g (18,4 mmol) de carbonato de cesio en 13 ml de agua desgasificada a 2,00 g (5,26 mmol) del compuesto del Ejemplo 41A y 215 mg (0,26

mmol) de complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]paladio/diclorometano en 213 ml de 1,2-dimetoxietano desgasificado. La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 2 h. Luego de enfriar, se agregaron 2,5 ml de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno y sulfato de sodio, la mezcla se filtró a través de gel de sílice y sulfato de sodio, la almohadilla de filtrado se lavó con acetato de etilo y el material filtrado se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). El producto luego se agitó con solución acuosa de bicarbonato de sodio, se acidificó con solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno, se retiró por filtración con succión, se lavó con agua y se secó. Esto dio 1,50 g (65% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

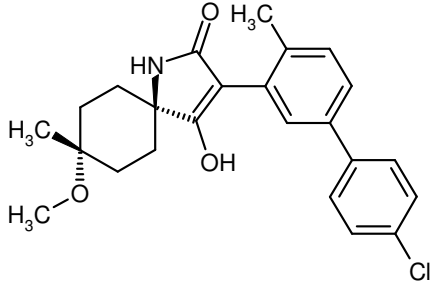
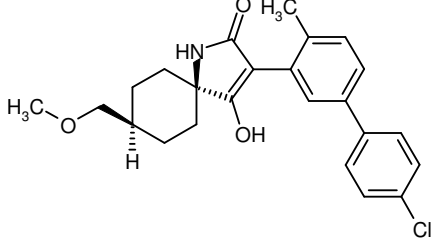
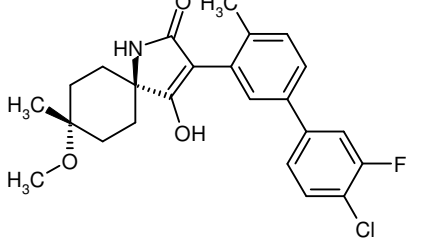
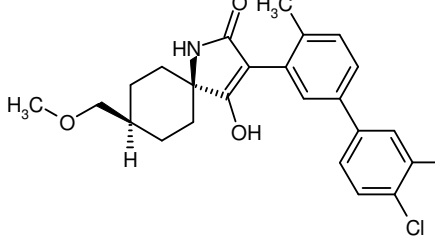
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,21 - 1,47 (m, 4H), 1,48 - 1,64 (m, 1H), 1,65 - 1,78 (m, 2H), 1,81 - 1,97 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 3,16 (d, 2H), 3,24 (s, 3H), 7,31 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,48 - 7,57 (m, 2H), 7,60 - 7,74 (m, 2H), 8,13 (s, 1H), 10,79 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): R_t = 1,26 min; MS (ESIpos): m/z = 430 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

La Tabla V provee una descripción de los ejemplos comparativos que el solicitante considera como al arte anterior más cercano

Tab. V

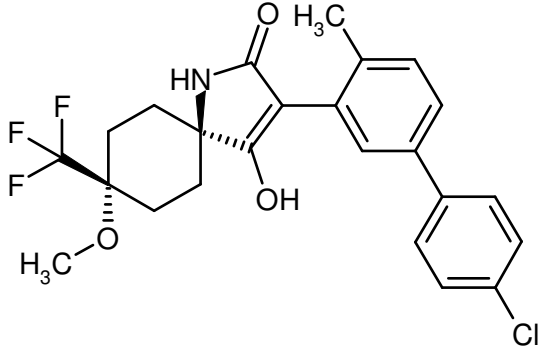
Ej.	Estructura/Nombre	Descrito en
V.1-a		Tabla 1, fila 20, p. 40 de WO10/063378
V.1-b		
V.1-c		
V.2-a		Tabla 2, fila 10, p. 45 de WO10/063378
V.2-b		
V.2-c		

Ej.	Estructura/Nombre	Descrito en
V.3-a		Tabla 1, fila 20, p. 40 de WO10/063378
V.3-b		
V.4-a		Tabla 2, fila 10, p. 45 de WO10/063378
V.4-b		

Ejemplos de trabajo:

Ejemplo 1-1

(5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



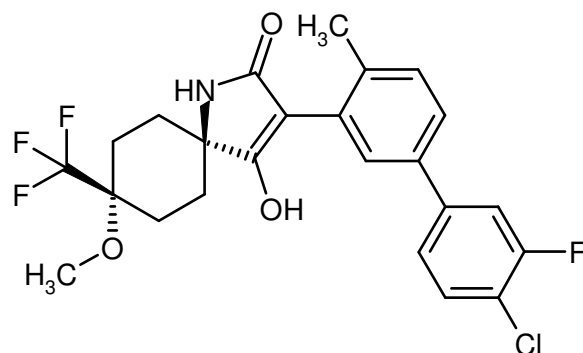
Se agregaron 3,07 g (27,31 mmol) de tert-butóxido de potasio a 6,80 g (13,66 mmol) de 1-[[[4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino]-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 32A) en 68 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó sobre 1500 ml de hielo-agua y se acidificó con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración, se secó y se purificó primero mediante cromatografía (columna: Chiralpak IA 5 µm, 250x30 mm; gradiente de hexano/etanol en presencia de ácido fórmico 0,1%). La concentración mediante evaporación y cristalización desde éter dietílico dio 3,57 g (56% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,25 - 1,41 (m, 2H), 1,83 - 1,99 (m, 4H), 2,00 - 2,14 (m, 2H), 2,15 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 7,28 (d, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,42 - 7,51 (m, 3H), 7,58 - 7,67 (m, 2H), 8,41 (s, 1H), 10,98 (s, 1H).

LC-MS (Método 1): Rt = 1,31 min; MS (ESIpos): m/z = 466 [M+H]⁺.

Ejemplo 1-2

(5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo argón, se agregaron 67,70 mg (0,083 mmol) de complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]paladio/diclorometano a 300,00 mg (0,69 mmol) de 3-(5-bromo-2-metilfenil)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona (Ejemplo 42A) en 28 ml de 1,2-dimetoxietano desgasificado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se agregaron 216,83 mg (1,24 mmol) de ácido (4-cloro-3-fluorofenil)borónico y una solución de 945,40 mg (2,90 mmol) de carbonato de cesio en 1 ml de agua desgasificada. La mezcla de reacción se calentó en un microondas a 150°C durante 40 min. Luego de enfriar, se agregó 0,4 ml de solución acuosa concentrada de cloruro de hidrógeno, la mezcla se filtró, el precipitado se lavó con diclorometano y con metanol y las fases orgánicas combinadas se concentraron bajo presión reducida. El producto crudo se purificó primero mediante cromatografía sobre gel de sílice (fase móvil: gradiente de hexano/acetato de etilo). La purificación final se llevó a cabo por cromatografía RP (fase móvil: gradiente de agua/ácido fórmico/acetonitrilo). Esto dio 43 mg (13% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,27 - 1,39 (m, 2H), 1,85

- 1,99 (m, 4H), 2,00 - 2,13 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 7,29 (d, 1H), 7,38 (d, 1H), 7,45 - 7,54 (m, 2H), 7,57 - 7,70 (m, 2H), 8,36 (s, 1H), 10,97 (s, 1H).

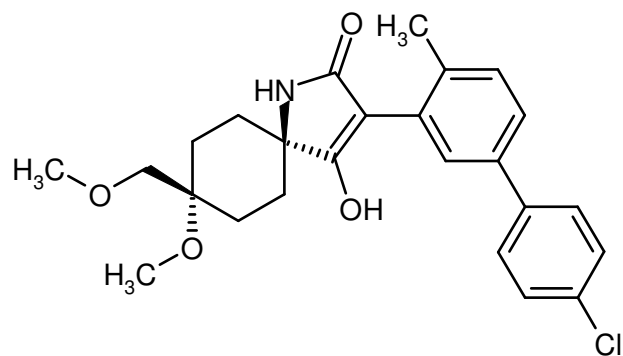
LC-MS (Método 1): Rt = 1,34 min; MS (ESIpos): m/z = 484 [M+H]⁺.

De manera alternativa, la estructura deseada puede prepararse de la siguiente manera:

Se agregaron 15,22 g (135,68 mmol) de tert-butóxido de potasio a 35,00 g (67,84 mmol) de 1-[(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)acetil]amino}-4-metoxi-4-(trifluorometil)ciclohexancarboxilato de metilo (Ejemplo 33A) en 350 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para el tratamiento posterior, la mezcla de reacción fría se volcó sobre 8000 ml de hielo-agua y se acidificó con ácido clorhídrico acuoso. El producto crudo se retiró por filtración, se secó y se purificó primero mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de diclorometano/acetato de etilo). El sólido obtenido se cristalizó a partir de éter dietílico. Esto dio 9,33 g (28% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

Ejemplo 1-3

(5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo nitrógeno, se agregaron 148 mg (1,32 mmol) de tert-butóxido de potasio a 570 mg (1,20 mmol) del compuesto del Ejemplo 35A en 5 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla luego se concentró, el residuo se colocó en hielo-agua y se acidificó con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N, la mezcla se agitó durante 30 minutos y se retiró por filtración con succión y el precipitado se lavó con agua y se secó. Por medio de dos HPLC preparativas [1. columna: Chromatorex C18, 10 μ m, 125 mm x 30 mm; fase móvil: gradiente de agua/acetonitrilo con adición de ácido fórmico 0,1%; 2. columna: Chiralpak IC, 5 μ m, 250 mm x 20 mm; fase móvil: hexano/etanol = 80/20 con adición de ácido fórmico 0,1%; velocidad de flujo: 25 ml/min; temperatura: temp. amb.], se separaron los diasterómeros. Esto dio 105 mg (20% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

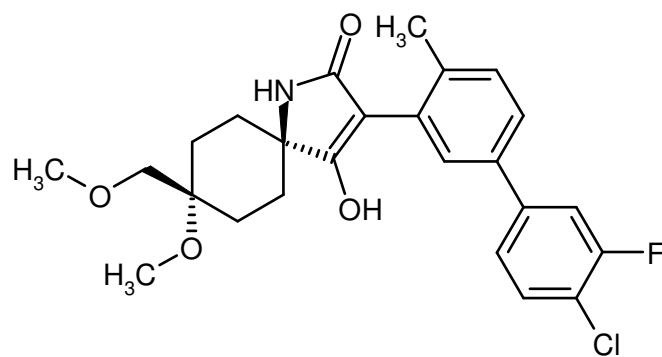
^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,12 - 1,27 (m, 2H), 1,48 - 1,65 (m, 2H), 1,75 - 1,88 (m, 2H), 1,99 - 2,14 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,28 (m, 5H), 7,30 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,44 - 7,54 (m, 3H), 7,61 - 7,69 (m, 2H), 8,10 (s, 1H), 10,83 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): R_t = 1,19 min; MS (ESIpos): m/z = 442

[M+H]⁺.

Ejemplo 1-4

(5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4,5]dec-3-en-2-ona



Bajo nitrógeno, se agregaron 1,64 g (14,7 mmol) de tert-butóxido de potasio a 6,55 g (13,3 mmol) del compuesto del Ejemplo 34A en 60 ml de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción luego se agregó a hielo-agua, se agregó solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N por goteo hasta haberse alcanzado un pH de 1-2, la mezcla se agitó durante 30 minutos y se retiró por filtración con succión, la almohadilla de filtrado se lavó con agua y el precipitado se secó. Para purificarse adicionalmente, el producto se disolvió en solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, se precipitó por acidificación con ácido clorhídrico acuoso 1 N, se agitó durante 30 minutos, se lavó con agua, se retiró por filtración y se secó. Esto dio 6,00 g (98% del rendimiento teórico) del compuesto del título.

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆): □ [ppm]= 1,12 - 1,26 (m, 2H), 1,50 - 1,65 (m, 2H), 1,76 - 1,89 (m, 2H), 1,98 - 2,15 (m, 2H),

2,19 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,28 (s, 5H), 7,31 (d, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,49 – 7,57 (m, 2H), 7,64 (t, 1H), 7,69 (dd, 1H), 8,14 (s, 1H), 10,82 (s, 1H).

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,21$ min; MS (ESIpos): $m/z = 460$ $[M+H]^+$.

3. Ensayos

3.1 Ensayos con la enzima ACC humana

Los datos de inhibición ACC1 y ACC2 se obtuvieron usando los dos ensayos que se describen más adelante. En la mayoría de los casos, se preparó una serie común de diluciones en serie de las sustancias de prueba para las dos mediciones, y luego se hicieron varias copias en placas de la sustancia a partir de esta serie de diluciones usando un pipeteador capilar de 50 nl para 384 pocillos (Hummingbird™ de Genomics Solutions). Estas se usaron luego en cada caso en el ensayo con ACC1 y ACC2 de manera tal, para una comparación óptima, las mediciones de inhibición de las dos enzimas se llevaran a cabo usando copias de la misma serie de dilución de la sustancia.

Ensayo enzimático con la ACC1 humana

La actividad inhibidora de hACC1 de las sustancias de esta invención se midió usando el ensayo de hACC1 que se describirá en los siguientes párrafos.

Esencialmente, la actividad enzimática se mide por cuantificación de la adenosina difosfato (ADP) formada como un producto secundario de las reacciones enzimáticas usando el sistema de detección de ADP-Glo™ de Promega. En esta prueba,

inicialmente la adenosina trifosfato (ATP) que no fue consumida en la reacción enzimática es convertida cuantitativamente con una adenilato ciclasa ("reactivo ADP-GLO") en AMPc, luego se detiene la adenilato ciclasa y ("reactivo de detección de quinasa") el ADP formado es convertido subsiguientemente en ATP, que es convertido en una reacción basada en luciferasa en una señal de luminescencia brillante.

La enzima usada era la ACC1 humana recombinante marcada con FLAG por el extremo C-terminal (variante 1 del transcripto de la acetil-coenzima A carboxilasa alfa) (GenBank, Acceso N° NM_198834), (aminoácidos 39 - final), expresada en células de insecto (Hi5) infectadas con baculovirus y purificadas por cromatografía de afinidad anti-FLAG.

Para el ensayo, se pipetearon 50 nl de una solución concentrada 100X de la sustancia de prueba en DMSO en una placa para microtitulación blanca de 384 pocillos de poco volumen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), se agregaron 2,5 µl de una solución de hACC1 en solución amortiguadora de ensayo [HEPES/NaOH 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2 mM, citrato de potasio 2 mM, NaHCO₃ 12 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0,005% (p/v)] y la mezcla se incubó durante 15 min para permitir la preunión de las sustancias a la enzima antes de la reacción enzimática. A continuación, se inició la reacción enzimática por adición de 2,5 µl de una solución de adenosina trifosfato (ATP, 100 µM => concentración final en 5 µl de volumen de ensayo: 50 µM) y acetil-CoA (20 µM => concentración final en 5 µl de volumen de

ensayo: 10 μM) en solución amortiguadora de ensayo, y la mezcla resultante se incubó a 22 °C para un tiempo de reacción de 45 min. La concentración de hACC1 se ajustó para la respectiva actividad de la enzima y se definió de manera tal que el ensayo se llevó a cabo en un rango lineal. Las concentraciones típicas se encontraban en el rango de 1,75 ng/ μl . La reacción se detuvo por adición de 2,5 μl del “reactivo ADP-GLO” (diluido 1:1,5 veces), y la mezcla resultante se incubó a 22 °C durante 1 h para convertir por completo el ATP sin reaccionar en AMPc. Luego se agregaron 2,5 μl del “reactivo de detección de quinasa” (1,2X más concentrado que lo recomendado por el proveedor), la mezcla resultante se incubó a 22 °C durante 1 h y después se midió la luminescencia usando un instrumento de medición adecuado (Viewlux o Topcount de Perkin-Elmer o Pherastar de BMG Labtechnologies). La cantidad de luz emitida se tomó como una medida para la cantidad de ADP formada y por lo tanto para la actividad enzimática de la hACC1. Los datos se normalizaron (reacción de enzima sin inhibidor = 0% de inhibición, todos los demás componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Habitualmente, las sustancias de prueba eran evaluadas sobre las mismas placas para microtitulación a 10 concentraciones diferentes en el rango entre 20 μM y 1 nM (20 μM , 6,7 μM , 2,2 μM , 0,74 μM , 0,25 μM , 82 nM, 27 nM, 9,2 nM, 3,1 nM y 1 nM, la serie de dilución preparadas antes del ensayo basado en la solución concentrada 100X por diluciones en serie 1:3) con dos replicas para cada concentración, y se calcularon

los valores de IC_{50} con un ajuste de 4 parámetros usando un software propio de los autores.

Ensayo enzimático con la ACC2 humana

La actividad inhibidora de hACC2 de las sustancias de esta invención se midió usando el ensayo de hACC2 que se describirá en los siguientes párrafos.

Esencialmente, la actividad enzimática se mide por cuantificación de la adenosina difosfato (ADP) formada como un producto secundario de las reacciones enzimáticas usando el sistema de detección de ADP-Glo™ de Promega. En esta prueba, inicialmente la adenosina trifosfato (ATP) que no fue consumida en la reacción enzimática es convertida cuantitativamente con una adenilato ciclasa ("reactivo ADP-GLO") en AMPc, luego se detiene la adenilato ciclasa y ("reactivo de detección de quinasa") el ADP formado es convertido subsiguientemente en ATP, que es convertido en una reacción basada en luciferasa en una señal de luminescencia brillante.

La enzima usada era la ACC2 humana recombinante marcada con FLAG por el extremo C-terminal (acetil-coenzima A carboxilasa 2) (GenBank, Acceso N° NP_001084), (aminoácidos 27 - final), expresada en células de insecto (Hi5) infectadas con baculovirus y purificadas por cromatografía de afinidad anti-FLAG. Para el ensayo, se pipetearon 50 nl de una solución concentrada 100X de la sustancia de prueba en DMSO en una placa para microtitulación blanca de 384 pocillos de poco volumen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), se agregaron 2,5 µl de una solución de hACC2 en solución amortiguadora de

ensayo [HEPES/NaOH 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 2 mM, citrato de potasio 2 mM, NaHCO_3 12 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0,005% (p/v)] y la mezcla se incubó durante 15 min para permitir la preunión de las sustancias a la enzima antes de la reacción enzimática. A continuación, se inició la reacción enzimática por adición de 2,5 μl de una solución de adenosina trifosfato (ATP, 100 μM => concentración final en 5 μl de volumen de ensayo: 50 μM) y acetil-CoA (20 μM => concentración final en 5 μl de volumen de ensayo: 10 μM) en solución amortiguadora de ensayo, y la mezcla resultante se incubó a 22 °C para un tiempo de reacción de 45 min. La concentración de hACC2 se ajustó para la respectiva actividad de la enzima y se definió de manera tal que el ensayo se llevó a cabo en un rango lineal. Las concentraciones típicas se encontraban en el rango de 2 ng/ μl . La reacción se detuvo por adición de 2,5 μl del "reactivo ADP-GLO" (diluido 1:1,5 veces), y la mezcla resultante se incubó a 22 °C durante 1 h para convertir por completo el ATP sin reaccionar en AMPc. Luego se agregaron 2,5 μl del "reactivo de detección de quinasa" (1,2X más concentrado que lo recomendado por el proveedor), la mezcla resultante se incubó a 22 °C durante 1 h y después se midió la luminescencia usando un instrumento de medición adecuado (Viewlux o Topcount de Perkin-Elmer o Pherastar de BMG Labtechnologies). La cantidad de luz emitida se tomó como una medida para la cantidad de ADP formada y por lo tanto para la actividad enzimática de la hACC2. Los datos se normalizaron (reacción

de enzima sin inhibidor = 0% de inhibición, todos los demás componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Habitualmente, las sustancias de prueba eran evaluadas sobre las mismas placas para microtitulación a 10 concentraciones diferentes en el rango entre 20 μM y 1 nM (20 μM , 6,7 μM , 2,2 μM , 0,74 μM , 0,25 μM , 82 nM, 27 nM, 9,2 nM, 3,1 nM y 1 nM, la serie de dilución preparadas antes del ensayo basado en la solución concentrada 100X por diluciones en serie 1:3) con dos replicas para cada concentración, y se calcularon los valores de IC_{50} con un ajuste de 4 parámetros usando un software propio de los autores.

3.2 Ensayos celulares

De acuerdo con la invención, las sustancias fueron evaluadas en ensayos basados en células por la capacidad de las sustancias para inhibir la proliferación de células tumorales después de una incubación de 96 horas con la sustancia. La viabilidad de las células se evaluó usando el ensayo de viabilidad de células luminescentes CellTiter-Glo® (Promega). Las células se sembraron a una densidad de 2000-5000 células/pocillo (dependiendo de la línea celular) en 100 μl de medio de crecimiento sobre placas para microtitulación de 96 pocillos. En cada línea celular examinada, las células se sembraron sobre una placa separada para determinar la luminescencia a $t = 0$ horas y $t = 96$ horas. Después de una incubación durante la noche a 37°C , se determinaron los valores de luminescencia para las muestras de $t = 0$. Las placas de dosis para el punto de tiempo de $t = 96$ fueron tratadas

con sustancias diluidas con medio de crecimiento. Las células se incubaron luego a 37 °C durante 96 horas, y luego se determinaron los valores de luminiscencia para las muestras de t = 96 horas. Para el análisis de los datos, se restaron los valores de t = 0 de los valores de t = 96 horas para las muestras tratadas y no tratadas. Las diferencias en el porcentaje de luminiscencia entre las muestras tratadas con sustancia y los valores control se usaron para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento.

Las sustancias se evaluaron en las siguientes líneas celulares que representan las indicaciones establecidas como sigue a modo de ejemplo:

Línea celular	Fuente	Indicación
MCF7	ATCC	carcinoma de mama positivo para receptores hormonales
KM12	NCI	carcinoma colorrectal
PC3	DMSZ	carcinoma de próstata negativo para receptores de andrógenos
H460	ATCC	carcinoma bronquial de células no pequeñas

ATCC: American Type Culture Collection [*Colección Americana de Cultivos Tipo*]

NCI: National Cancer Institute [*Instituto Nacional de Cáncer*]

DMSZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

3.3 Análisis de la expresión de ACC1 en tejido tumoral y

tejido normal

La expresión de ACC1 se determinó usando un microordenamiento. Para tal fin, se aisló el ARN de diversos tejidos tumorales y de los correspondientes tejidos normales. En el método se empleó el reactivo de extracción de ARN Trizol (Invitrogen) y purificación subsiguiente usando el miniconjunto de elementos RNeasy (Qiagen). Aún más, se condujo una digestión con DNasa I (Qiagen) para eliminar el ADN genómico. Para el control de calidad, se analizó el ARN total con la ayuda de un ARN LabChip en una plataforma Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), y se determinó la concentración de ARN usando el sistema Peqlab NanoDrop. Para la hibridación, se usó el ensayo de marcado de blancos eucariotas de un ciclo de Affymetrix, y luego se leyó el ordenamiento usando un escáner Affymetrix GeneChip 3000 (Affymetrix). La evaluación y el control de calidad se llevaron a cabo usando el software Expression Pro 4.0 Refiner (GeneData).

3.4 Ensayos para determinar el coeficiente de distribución de octanol/agua ($\log P/D$), la afinidad de membrana ($\log MA$) y la unión de la proteína a la albúmina sérica humana (K_d HSA)

Ensayo para determinar el coeficiente de distribución de octanol/agua ($\log P/D$):

El coeficiente de distribución de octanol/agua P o D es un parámetro clave para estimar la penetración y permeabilidad de membranas. Se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia en el sistema de dos fases de octanol/agua.

$$P/D = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{water}}}$$

P = partición

D = distribución

c(octanol) = concentración de la sustancia en la fase de octanol

c(agua) = concentración de la sustancia en la fase acuosa

Habitualmente se expresa en la forma del logaritmo en base diez (logP o logD).

El logP describe el comportamiento de la distribución de una sustancia presente exclusivamente en su forma neutra. El logD describe el comportamiento de la distribución de una sustancia a un pH determinado; dependiendo de la constante de ionización pKa de la sustancia, parte de la sustancia puede estar en su forma iónica y parte en su forma neutra.

El logP/D de los compuestos activos se determinó usando un método de HPLC isocrático (HPLC = cromatografía líquida de alta presión) (bibliografía: *OECD Guideline for Testing of Chemicals* N° 117). El método se basa en la correlación del tiempo de retención en la HPLC de la sustancia de prueba con las sustancias de referencia que tienen coeficientes de distribución conocidas.

La sustancia de prueba se empleó como una solución 10 mM en DMSO (DMSO = dimetilsulfóxido). Se llevaron 10 µl de esta solución a 100 µl con una mezcla de metanol/agua en una relación de 7 + 3.

Las nueve sustancias de referencia se disolvieron individualmente en metanol. La concentración se muestra en la Tabla

1. Se agregaron 100 µl de cada una de las soluciones madre en viales de HPLC y se mezclaron con 300 µl de agua.

Tabla 1

Sustancia de referencia	log P	Tiempo de retención aproximado [min]	Masa molar	Solución madre incorporada [mg/10 ml]
acetanilida	1,0	0,8	135,2	12
alcohol 4-metil-bencílico	1,6	0,9	122,2	15
benzoato de metilo	2,1	1,1	136,2	18
benzoato de etilo	2,6	1,4	150,2	19
naftaleno	3,6	2,1	128,2	3
1,2,4-tricloro-benceno	4,2	3,4	181,5	14
2,6-difenilpiridina	4,9	4,6	231,3	5
trifenilamina	5,7	8,0	245,3	8
DDT	6,2	10,3	354,5	10

Se usó una solución de formamida para determinar el tiempo de espera. Para tal fin, se disolvieron 7 mg de formamida en 10 ml de metanol. Se mezclaron 100 µl de esta solución madre con 500 µl de metanol y 200 µl de agua.

Todas las soluciones fueron sometidas a cromatografía usando una velocidad de flujo de 1,00 ml/min.

Condiciones cromatográficas:

Sistema de HPLC Waters Alliance HT 2790

Detector UV	DAD Waters 996
Detector MS	MS Micromass ZQ
Software HPLC	MassLynx 4.1 de Waters
Columna	Spherisorb ODS 3 μm 4,6 x 60 mm
Fase móvil:	metanol + agua con acetato de amonio 0,01 M (0,77 g/litro)
	75 + 25, pH 7,0
Volúmenes de inyección:	
formamida	5 μl
Referencias	5 μl
sustancia de prueba	15 μl

Protocolo de inyección:

formamida, referencias, sustancia de prueba 1, sustancia de prueba 2, ..., formamida, referencias.

La evaluación de los tiempos de retención se realizó con un detector con arreglo de diodos (DAD) a 200–400 nm. La masa molecular permitió comprobar la identidad de la sustancia de prueba usando el espectrómetro de masa corriente abajo.

La corrida de HPLC se evaluó usando el software Masslynx 4.1 de Waters.

Los valores de logP/D se calcularon usando el software "POW Determination" (desarrollo de los autores).

Ensayos para determinar el logMA de afinidad de membrana y la unión de proteínas a la albúmina sérica humana (HSA):

La determinación de la afinidad de membrana y unión de las proteínas a la albúmina sérica humana (HSA) se llevó a cabo utilizando la tecnología Transil (referencia: A. Loidl-

Stahlhofen, A. Eckert, T. Hartmann, M. Schöttner *J Pharm Sci* 90, 599-606 (2001)). La tecnología Transil® (disponible comercialmente de Sovicell en Leipzig, Alemania) comprende esferas de vidrio (10-12 μm de diámetro) recubiertas con una membrana de dos capas de fosfatidilcolina (MA-Transil) o con albúmina sérica humana unida de manera covalente (HSA-Transil).

Para determinar el logMA y la constante de unión de las proteínas a HSA, se usó el conjunto de elementos para ensayo combinado de absorción intestinal y unión a HSA TRANSIL disponible comercialmente. Esta es una placa para microtitulación de 96 pocillos (MTP de 96 pocillos) llena con Transil y se puede usar para determinar la unión de MA-Transil y HSA-Transil en cada caso de los ocho compuestos activos. Para cada compuesto activo, la placa de Transil provee una fila de 12 pocillos. Dos de los pocillos sirven como referencia y solamente están llenos con solución amortiguadora de pH 7,4. Otros cinco pocillos contienen MA-Transil a varias concentraciones crecientes, los cinco pocillos remanentes contienen HSA-Transil a varias concentraciones crecientes.

Para determinar la unión de un compuesto activo a Transil, se cuantificó el sobrenadante de los pocillos con Transil contra la solución de referencia sin Transil mediante acoplamiento con HPLC-MS (HPLC-MS = cromatografía líquida de alta presión/espectrometría de masa).

A continuación se describe la manera en que se llevaron a cabo los pasos individuales del ensayo:

Los compuestos activos fueron suministrados en una de MTP de 96 pocillos del almacenamiento interno de la sustancia. Esta placa se conoce como la placa madre. Cada pocillo contenía 30 μ l de una solución 10 mmol del compuesto activo en DMSO (dimetilsulfóxido). Se llenaron dos pocillos al comienzo (pocillo A1) y al final de la placa (pocillo H12) con 30 μ l de una solución 10 mmol de warfarina en DMSO. La warfarina, cuya afinidad de membrana y unión a HSA es conocida, sirve para comprobar si la medición es correcta. La placa madre se usó para preparar una placa hija con una dilución de 1 a 4000 con una mezcla de solución amortiguadora de pH 7,4 y DMSO a una relación de 1+1. La concentración del compuesto activo de cada pocillo era de 2,5 μ mol/litro, el volumen de cada pocillo era de 400 μ l.

Los 96 compuestos activos de la placa hija se dividieron sobre 12 placas Transil en total, usando un robot pipeteador Hamilton de Microlab STAR. Se retiraron 20 μ l 12 veces de cada pocillo de la placa hija. La concentración en cada pocillo de la placa Transil era 0,25 μ mol/litro, que corresponde a una dilución de 1 a 10. El contenido de DMSO era del 5%.

Cada una de las placas Transil llenas se resuspendió durante dos minutos, luego se dejaron asentar a temperatura ambiente durante por lo menos dos minutos y luego se centrifugaron a 600 rotaciones por minuto durante cinco minutos. El robot pipeteador se usó luego para separar 20 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa Transil y para transferirlos a

una placa para microtitulación separada. Ahora, los sobrenadantes de cada una de las cuatro placas Transil se agruparon en una placa para microtitulación, de modo que al final había tres placas para microtitulación agrupadas que en cada caso contenía 80 µl de solución y una concentración de compuesto activo de 62,5 nM por pocillo.

Antes de la cuantificación de los compuestos activos por HPLC-MS, era necesario efectuar una optimización para cada compuesto activo donde por medio de una sola inyección se determinan el ion hijo y los voltajes eléctricos óptimos. Para tal fin, se preparó por medio del robot pipeteador una dilución de la placa madre de 1 en 10 000 000 en una mezcla de acetonitrilo/agua a una relación de 8 + 2 en una placa para microtitulación separada.

Esta placa para microtitulación se midió por HPLC-MS usando el software Discovery Quant Optimize de AB Sciex. Las tres placas para microtitulación agrupadas se midieron por HPLC-MS usando el software Discovery Quant Analyze de AB Sciex.

Condiciones cromatográficas:

Sistema de HPLC-MS: HPLC de resolución rápida Agilent 1200
 Espectrómetro de masa Sciex Triple Quad
 5500 (de AB Sciex)
 Muestreador automático DLW PAL opcional
 Software: Analyst 1.4 (de AB Sciex)
 Discovery Quant Optimize (de AB Sciex)
 Discovery Quant Analyze (de AB Sciex)

Optimización:

Columna: capilar
 Volumen de inyección: 5 µl
 Velocidad de flujo: 0 min: -> 80 µl/min
 0 - 0,19 min: -> 80 µl/min
 0,20 - 0,65 min: -> 30 µl/min
 0,66 - 0,7 min: -> 150 µl/min
 Fase móvil: A = acetonitrilo + 0,05% de ácido
 fórmico
 B = agua + 0,05% de ácido fórmico
 A:B isocrático, 8 + 2

Análisis:

Columna: Poroshell 120 SB-C18 2,7 µm 3 x 30
 mm
 Volumen de inyección: 2 µl
 Velocidad de flujo: 1 ml/min:
 Fase móvil: gradiente
 A = acetonitrilo + 0,05% de ácido
 fórmico
 B = agua + 0,05% de ácido fórmico
 0 min: -> 95% de A, 5% de B
 0 - 1,0 min: -> 5% de A, 95% de B
 con aumento tipo lineal
 1,0 - 2,2 min: -> 5% de A, 95% de
 B, isocrático
 2,21 - 2,3 min: -> 95% de A, 5% de
 B, isocrático

3.5 Determinación de la unión con proteínas del plasma por

diálisis en equilibrio:

La unión de las sustancias de prueba a proteínas plasmáticas se determina por diálisis de equilibrio con el aparato de diálisis Ht (96 pocillos) que es de Teflon y una membrana semipermeable (celulosa regenerada, MWCO 12-14 K). Permite separar 150 µl de cada una de un lado de plasma y un lado de solución amortiguadora (solución amortiguadora de fosfato 50 mM). La sustancia de prueba se agrega a 2 concentraciones (habitualmente de 3 y 0,3 µM) al lado del plasma y se une a las proteínas plasmáticas. La fracción no unida de la sustancia de prueba pasa a través de la membrana y se distribuye a cada lado hasta establecer el equilibrio (después de aproximadamente 6-8 h a 37 °C). La concentración de la sustancia del lado de la solución amortiguadora y del lado del plasma se determina mediante análisis de LC-MS. Para ello, ambos lados son llevados por dilución con solución amortiguadora o plasma a la misma matriz (10% de plasma) y luego precipitación con metanol. La fracción libre (no unida) (fu, por sus siglas en inglés; fnu: fracción no unida) se calcula a partir del cociente de la concentración de solución amortiguadora y de plasma. Se corren pruebas de estabilidad y pruebas de recuperación de manera concurrente como controles. Además, la sustancia en solución amortiguadora es dializada contra la solución amortiguadora, para verificar la unión no específica al aparato y a la membrana y el establecimiento del equilibrio. Dado que durante la incubación la presión osmótica de las proteínas plasmáticas conduce a la dilución del

plasma (cambio de volumen), este posible error se determina pesando las muestras de plasma blanco y se incluye en el cálculo de la *fu*. El establecimiento del equilibrio y la estabilidad del plasma deberían tener un valor no menor que un 80% y la recuperación debería ser de por lo menos un 30%. Una fracción libre <1% es considerada alta, entre 1 y 10% es moderada y >10% es una baja unión a la proteína plasmática.

3.6 Parámetros farmacocinéticos

Determinación de los parámetros farmacocinéticos de una sustancia de prueba en rata y en perro

Para ello, las sustancias de prueba se aplicaron en una forma disuelta para ambas aplicaciones intravenosa e intragástrica, en donde se usaron solubilizantes compatibles, tales como PEG400 y/o etanol, en una cantidad compatible.

Administración intravenosa

Las sustancias de prueba se aplicaron a una dosis de 0,1-1 mg/kg. La administración se realizó como una inyección de bolo en la rata macho y como una infusión en la perra (15 min). En varios puntos de tiempo después de la inyección del bolo, y antes y después de la infusión de 15 minutos, se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 100-150 µl por un catéter, ya sea de la vena yugular (rata) o de la vena safena (perra). Se agregó litio-heparina como anticoagulante a las muestras de sangre y se guardaron en un refrigerador hasta su uso en un procesamiento adicional. Después de centrifugar las muestras durante 15 min a 3000 rpm, se tomó una alícuota de 100 µl del sobrenadante (plasma) y se precipitó

por adición de 400 µl de ACN frío o metanol (absoluto). Las muestras precipitadas se descongelaron a 20°C durante la noche, luego se volvieron a centrifugar a 3000 rpm durante 15 min, antes de separar 150 µl del sobrenadante claro para determinar la concentración. El análisis se efectuó utilizando un sistema Agilent 1200 HPLC conectado a detección por LCMS/MS.

Cálculo de los parámetros PK (usando un software de cálculo de PK, por ejemplo WinNonLin®): CLplasma: depuración total del plasma de la sustancia de prueba (en l*kg/h); CLsangre: depuración total de sangre de la sustancia de prueba (en l*kg/h), donde $(CL_{\text{sangre}} = CL_{\text{plasma}} * C_p / C_b)$; Vss: volumen de distribución en estado estable aparente (en l/kg); t_{1/2}: vida media en un intervalo especificado (aquí: t_{1/2} terminal, en h); AUC_{norm}: área bajo el perfil de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero extrapolado al infinito dividido por la dosis normalizada para el peso corporal (en kg*l/h); AUC(0-t_n)_{norm}: área integrada bajo el perfil de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero hasta el último punto de tiempo en el cual la concentración en plasma era medible, dividido por la dosis normalizada para el peso corporal (en kg*l/h); C_{máx}: concentración máxima de la sustancia de prueba en el plasma (en µg/l); C_{máx,norm}: concentración máxima de la sustancia de prueba en el plasma dividida por la dosis normalizada para el peso corporal (en kg/l); C_b/C_p: relación de la distribución de la concentración de sangre a plasma.

Administración intragástrica:

Las sustancias de prueba fueron administradas a ratas macho o perras en ayuno a una dosis de 0,3-1 mg/kg por vía intragástrica como un bolo usando un tubo de alimentación. En varios puntos de tiempo después de la administración, se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 100-150 μ l por un catéter, ya sea de la vena yugular (rata) o de la vena safena (perra). Se agregó litio-heparina como anticoagulante a las muestras de sangre y se guardaron en un refrigerador hasta su uso en un procesamiento adicional. Después de centrifugar las muestras durante 15 min a 3000 rpm, se tomó una alícuota de 100 μ l del sobrenadante (plasma) y se precipitó por adición de 400 μ l de ACN frío o metanol (absoluto). Las muestras precipitadas se descongelaron a -20°C durante la noche, luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, antes de separar 150 μ l del sobrenadante claro para determinar la concentración. El análisis se efectuó utilizando un sistema Agilent 1200 HPLC conectado a detección por LCMS/MS. Cálculo de los parámetros PK (usando un software de cálculo de PK, por ejemplo WinNonLin®):

AUCnorm: área bajo el perfil de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero extrapolado al infinito dividido por la dosis normalizada para el peso corporal (en $\text{kg}\cdot\text{l/h}$). AUC(0- t_n)norm: área integrada bajo el perfil de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero hasta el último punto de tiempo en el cual la concentración en plasma era medible, dividido por la dosis normalizada para

el peso corporal (en $\text{kg} \cdot \text{l/h}$). $\text{C}_{\text{máx}}$: concentración máxima de la sustancia de prueba en el plasma (en $\mu\text{g/l}$). $\text{C}_{\text{máx,norm}}$: concentración máxima de la sustancia de prueba en el plasma dividido por la dosis normalizada para el peso corporal (en kg/l). $t_{1/2}$: vida media dentro de un intervalo especificado (aquí: $t_{1/2}$ terminal, en h). $\text{Fobs\%}$: biodisponibilidad oral observada, $\text{AUC}(0\text{--}t_n)\text{norm}$ después de la administración i.g. dividido por $\text{AUC}(0\text{--}t_n)\text{norm}$ después de la administración i.v.. $t_{\text{máx}}$: punto de tiempo en el cual se mide la concentración máxima de la sustancia de prueba en el plasma.

Para calcular la biodisponibilidad relativa de una sustancia de prueba, se divide el valor de $\text{AUC}(0\text{--}t_n)\text{norm}$ después de la administración i.g. de una suspensión de una sustancia microcristalina por el valor de $\text{AUC}(0\text{--}t_n)\text{norm}$ después de la administración de una solución de sustancia.

3.7. Actividad *in vivo*

Modelo de xenoinjerto

Se usaron modelos de xenoinjerto en ratones inmunosuprimidos para determinar la actividad antitumoral en organismos vivos. Para tal fin, se determinó inicialmente la dosis máxima tolerable (MTD) usando el siguiente protocolo:

Sobre un período de 3 semanas, se administró una dosis definida de la sustancia de prueba, diariamente por vía oral, a ratones hembra desnudas (ratones NMRI-desnudos (nu/nu), Taconic M&B A/S), y los ratones fueron observados diariamente por la mortalidad y el peso corporal. El valor de la MTD se definió como la dosis más alta que podía ser administrada

sin la muerte de ningún animal durante la fase de tratamiento, y sin una pérdida de peso corporal mayor que un 10% en comparación con el peso inicial.

Se usaron los modelos de xenoinjerto en donde las sustancias de prueba fueron administradas a su MTD o, si no fue posible determinar esto de antemano, a la dosis más alta que pudo ser formulada en el vehículo estándar, y en algunos casos también a dosis más bajas, para determinar la actividad antitumoral. Se empleó primariamente un modelo de carcinoma de próstata con células PC-3 humanas independientes de hormonas en ratones macho desnudos (ratones NMRI-desnudos (nu/nu), Taconic M&B A/S). Para tal fin, se inyectaron 3 millones de células tumorales (suspendidas en medio + Matrigel 1:1, volumen final de 0,1 ml) por vía subcutánea en el costado de cada animal. Cuando los tumores se habían extendido por un área de 20-30 mm², los ratones eran asignados aleatoriamente a grupos de terapia y se inició la terapia. Luego se continuó con la terapia hasta que se había alcanzado un tamaño tumoral promedio de 130-160 mm² en el grupo control, que solamente había recibido el vehículo de la sustancia de prueba, o en uno de los grupos de tratamiento, midiéndose el área tumoral y el peso corporal 2-3 veces por semana. En este punto de tiempo, se terminó el experimento en todos los grupos y se pesaron los tumores preparados.

El valor de T/C se calculó como un parámetro de suceso primario usando el efecto sobre el peso final del tumor: Media del peso del tumor en el grupo de tratamiento dividido por

la media del peso del tumor en el grupo de vehículo.

4. Resultados:

4.1. Ensayo enzimático

En la Tabla 2 se resumen los resultados de los ejemplos de trabajo y de los ejemplos comparativos de los ensayos enzimáticos. Para la determinación exacta de la selectividad, se compararon las mediciones de la inhibición de ACC1 y de ACC2 (determinaciones de la IC50 en cada caso) en cada caso por pares, con las copias de la misma serie de dilución de sustancia que se usó en los dos ensayos. Si cualquiera de las determinaciones de IC50 de ACC1 o de ACC2 no era evaluada debido a una calidad insuficiente de los datos, ambas mediciones eran descartadas y no se incluyeron en la tabla. La selectividad de la inhibición de ACC1 vs. la inhibición de ACC2 se determinó luego como la media de las selectividades observadas en las mediciones individuales.

Tabla 2

Ejem- plo	Nº mediciones	Nº preparaciones	ACC 1 IC50 [µmol/l]	ACC 2 IC50 [µmol/l]	Relación de las IC50 de ACC2/ACC1 (medición respec- tiva)	Selectivi- dad de ACC1 vs. ACC2 (media de las medicio- nes indivi- duales ± desviación estándar)
1-1	1	1	0,231	11,5	50	49 ± 27

	2	1	0,244	13,5	55	
	3	2	0,044	3,31	75	
	4	2	0,067	4,15	62	
	5	3	0,087	6,46	74	
	6	3	0,078	7,42	95	
	7	1	0,162	3,39	21	
	8	1	0,186	4,50	24	
	9	4	0,099	0,98	10	
	10	4	0,069	1,57	23	
V.1-a	1	1	0,108	3,13	29	28,2 ± 8,5
	2	1	0,182	3,93	22	
	3	2	0,132	4,54	34	
	4	3	0,097	2,53	26	
	5	4	0,055	2,33	42	
	6	3	0,104	2,51	24	
	7	4	0,213	3,36	16	
	8	5	0,137	2,75	20	
	9	5	0,151	2,03	13	
	10	6	0,081	2,86	35	
	11	6	0,091	3,32	36	
	12	7	0,147	5,14	35	
	13	7	0,158	5,20	33	
V.1-b	1	1	0,109	1,22	11,2	9,8 ± 1,4
	2	1	0,111	0,94	8,4	
1-2	1	1	0,092	2,76	29,9	21,6 ± 5,9
	2	1	0,094	1,69	18,1	
	3	1	0,119	2,01	16,9	

V.2-a	1	1	0,083	9,56	114,8	57,2 ± 26,4
	2	2	0,249	9,20	37,0	
	3	3	0,063	4,99	79,1	
	4	3	0,067	5,80	87,1	
	5	4	0,154	8,63	55,9	
	6	4	0,184	7,81	42,4	
	7	5	0,184	8,81	48,0	
	8	6	0,090	3,99	44,5	
	9	4	0,087	2,14	24,8	
	10	4	0,075	2,90	38,5	
V.2-b	1	1	0,067	0,580	8,6	9,4 ± 0,8
	2	1	0,059	0,610	10,3	
1-3	1	1	0,165	8,08	49,0	47,0 ± 2,1
	2	1	0,146	6,55	44,9	
V.3-a	1	1	0,108	3,13	28,9	28,2 ± 8,5
	2	1	0,182	3,93	21,6	
	3	2	0,132	4,54	34,4	
	4	3	0,097	2,53	26,1	
	5	4	0,055	2,33	42,3	
	6	3	0,104	2,51	24,2	
	7	4	0,213	3,36	15,7	
	8	5	0,137	2,75	20,1	
	9	5	0,151	2,03	13,4	
	10	6	0,081	2,86	35,2	
	11	6	0,091	3,32	36,5	
	12	7	0,147	5,14	35,1	
	13	7	0,158	5,20	33,0	

V.3-b	1	1	0,092	0,591	6,4	6,4
1-4	1	1	0,104	4,35	41,7	30,8 ± 8,5
	2	1	0,133	4,06	30,6	
	3	2	0,131	3,05	23,3	
	4	2	0,116	3,82	33,1	
	5	3	0,084	3,30	39,0	
	6	3	0,123	2,12	17,2	
V.4-a	1	1	0,083	9,56	114,8	57,2 ± 26,4
	2	2	0,249	9,20	37,0	
	3	3	0,063	4,99	79,1	
	4	3	0,067	5,80	87,1	
	5	4	0,154	8,63	55,9	
	6	4	0,184	7,81	42,4	
	7	5	0,184	8,81	48,0	
	8	6	0,090	3,99	44,5	
	9	4	0,087	2,14	24,8	
	10	4	0,075	2,90	38,5	
V.4-b	1	1	0,073	1,118	15,2	15,2

Estos datos muestran que los compuestos sin un grupo trans-metoxi presentan una selectividad marcadamente más pobre contra la ACC2 humana. Algunas estructuras relacionadas del arte anterior que contienen un grupo trans-metoxi en la posición 8 del sistema de anillos de azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona también inhiben fuertemente a la ACC1 y son selectivas contra la ACC2. Esta propiedad de las estructuras del arte anterior era desconocida, no era evidente y no era factible su descubrimiento sin un esfuerzo no razonable.

4.2 Ensayos celulares

En la Tabla 3 se resumen los resultados del ensayo celular de los ejemplos de trabajo y los ejemplos comparativos.

Tabla 3

Ejemplo	IC50 de KM12 ($\mu\text{mol/l}$)	IC50 de PC3 ($\mu\text{mol/l}$)	IC50 de H460 ($\mu\text{mol/l}$)	IC50 de MCF7 ($\mu\text{mol/l}$)
1-1	0,021	0,029	0,088	0,026
V.1-a	0,038	0,035	0,079	0,023
V.1-b	0,037	0,038	0,057	0,035
V.1-c	0,827	0,275	1,870	0,288
1-2	0,014	0,022	0,104	<0,014
V.2-a	0,073	0,046	0,082	0,032
V.2-b	0,245	0,398	0,573	0,030
V.2-c	2,370	0,767	2,120	0,309
1-3	0,222	0,194	0,365	0,045
V.3-a	0,038	0,035	0,079	0,023
V.3-b	0,031	0,036	0,067	0,023
1-4	0,096	0,120	0,333	0,048
V.4-a	0,073	0,046	0,082	0,032
V.4-b	0,035	0,030	0,043	0,020

4.3 Expresión de ACC1 en tejido tumoral y en tejido normal

La expresión de ACC1 en el tejido tumoral y el correspondiente tejido normal se determinó con microordenamientos (Fi-

gura 1). En los carcinomas de mama, los carcinomas colorrectales, los carcinomas bronquiales y los carcinomas de páncreas, la expresión de ACC1 estaba significativamente sobre-regulada en comparación con el tejido normal.

4.4 Coeficiente de distribución de octanol/agua (logP/D), afinidad de membrana (logMA) y unión de proteínas a la albúmina sérica humana (K_d HSA)

En la Tabla 4 se muestran los valores determinados del logP/D, del logMA y de la K_d HSA.

La evaluación de los picos de HPLC se llevó a cabo usando Discovery Quant Analyze. Los resultados (logMA y constante de unión a HSA K_d) se calcularon usando un libro de Excel provisto por Sovicell.

Tabla 4

Ejemplo	logP/D, pH 7,4	logMA	K _d HSA [μmol/l]
1-1	2,44 (2,4-2,5, n = 5)	1,78 (1,6-1,9, n = 5)	1,73 (1,32-2,16, n = 5)
V.1-a	2,51 (2,4-2,6, n = 7)	1,4 (0,9-1,7, n = 7)	4,84 (3,66-6,18, n = 7)
V.1-b	2,23 (1,8-2,5, n = 3)	2,38 (2,0-2,7, n = 4)	3,07 (2,38-2,8, n = 3)
V.1-c	1,6 (n = 1)	2,1 (n = 1)	6,9 (n = 1)
1-2	2,45 (2,4-2,5, n = 2)	1,8 (n = 1)	1,79 (n = 1)

V.2-a	2,52 (2,5-2,6, n = 8)	1,67 (1,2-1,9, n = 6)	2,8 (2,42-3,67, n = 6)
V.2-b	2,55 (2,4-2,7, n = 2)	2,55 (2,4-2,7, n = 2)	1,43 (1,16-1,7, n = 2)
V.2-c	1,3 (n = 1)	2,3 (n = 1)	1,38 (n = 1)
1-3	2,3 (n = 1)	<1,0 (n = 1)	4,8 (n = 1)
V.3-a	2,51 (2,4-2,6, n = 7)	1,4 (0,9-1,7, n = 7)	4,84 (3,66-6,18, n = 7)
V.3-b	2,5 (2,5, n = 4)	2,08 (1,9-2,3, n = 4)	4,2 (3,41-4,89, n = 4)
1-4	2,38 (2,3-2,4, n = 5)	1,14 (0,9-1,3, n = 5)	2,85 (1,96-3,4, n = 5)
V.4-a	2,52 (2,5-2,6, n = 8)	1,67 (1,2-1,9, n = 6)	2,8 (2,42-3,67, n = 6)
V.4-b	2,57 (2,5-2,6, n = 3)	2,13 (2,1-2,2, n = 3)	3,64 (2,48-5,18, n = 3)

4.5 Unión a la proteína plasmática por diálisis de equilibrio

En la Tabla 5 se muestra la unión a proteínas plasmáticas

humanas, de ratón y de rata, determinada por análisis del equilibrio.

Tabla 5

Ejemplo	fu [%] (hu- mano)	fu [%] (ra- tón)	fu [%] (rata)	fu (ratón)/fu (humano)
1-1	0,2 (0,18-0,23, n = 2)	0,82 (0,75-0,88, n = 2)	-	4
V.1-a	0,38 (0,33-0,44, n = 2)	2,49 (2,35-2,62, n = 2)	0,23 (n = 1)	7
V.1-b	0,07 (n = 1)	2,41 (n = 1)	-	34
V.1-c	-	-	-	-
1-2	0,26 (n = 1)	1,4 (1,29-1,51, n = 2)	-	5
V.2-a	0,39 (n = 1)	2,8 (n = 1)	0,23 (0,22- 0,25, n = 2)	7
V.2-b	0,05 (n = 1)	1,9 (n = 1)	-	39
V.2-c	-	-	-	-
1-3	0,41 (0,40-0,42, n = 2)	3,8 (3,57-4,02, n = 2)	-	9

V.3-a	0,38 (0,33-0,44, n = 2)	2,49 (2,35-2,62, n = 2)	0,23 (n = 1)	7
V.3-b	0,36 (0,35-0,38, n = 2)	10,87 (10,4-11,3, n = 2)	7,79 7,25- 8,33 (n = 2)	30
1-4	0,37 (0,37-0,38, n = 2)	2,17 (2,06-2,28, n = 2)	0,21 (n = 2)	6
V.4-a	0,39 (n = 1)	2,8 (n = 1)	0,23 (0,22- 0,25, n = 2)	7
V.4-b	1,41 (n = 1)	1,76 (n = 1)	0,11 (n = 1)	1

4.6 Parámetros farmacocinéticos

Parámetros farmacocinéticos obtenidos de ratas.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos de ratas.

Tabla 6

Ejemplo	CL _{plasma} (l/h/kg)	CL _{sangre} (l/h/kg)	T ½ [h]	V _{ss} [l/kg]	F [%]
1-1	0,006	0,011	103	0,85	163
V.1-a	0,009	–	28	0,3	83
V.1-b	–	–	–	–	–
V.1-c	–	–	–	–	–

1-2	0,029	0,039	65	2,4	131
V.2-a	0,013	-	33	0,51	71
V.2-b	-	-	-	-	-
V.2-c	-	-	-	-	-
1-3	0,002	0,005	79	0,29	68
V.3-a	0,009	-	28	0,3	83
V.3-b	-	-	-	-	-
1-4	0,007	0,011	51	0,44	83
V.4-a	0,013	-	33	0,51	71
V.4-b	-	-	-	-	-

4.7 Eficacia in vivo

Dosis máxima tolerada (MTD) en ratón

Se administraron los ejemplos 1-1, V.1-a/V.3-a, V.2-a/V.4-a y 1-4 a ratones hembra desnudas (NMRI nu/nu):

Dosificación: véase la Tabla 7

Ruta de administración: oral

Vehículo: PEG400/etanol/Solutol HS 15
(70/5/25, v/v/v)

(Solutol HS15: polioxietilen éster del ácido 12-hidroxies-teárico)

Volumen de administración: 10 ml/kg:

Protocolo: véase la Tabla 7

La fase de tratamiento fue seguida por una fase de observa- ción de 21 días. Las muertes producidas durante este período y el efecto sobre el peso corporal se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

Sustancia	Dosis (mg/kg)	Protocolo	Cambio máximo en el peso corporal (%)	Muer-tes
1-1	12,5	21 días, 1 administración por día	más 12	0 de 4
1-1	25	21 días, 1 administración por día	más 11	0 de 4
1-1	50	21 días, 1 administración por día	más 10	1 de 4
1-1	75	21 días, 1 administración por día	más 11	0 de 4
1-1	100	21 días, 1 administración por día	más 16	0 de 4
V.1-a/V.3-a	25	21 días, 1 administración por día	más 7	0 de 4
V.1-a/V.3-a	50	21 días, 1 administración por día	más 17	0 de 4
V.1-a/V.3-a	100	21 días, 1 administración por día	más 23	0 de 4

V.2-a/V.4-a	10	21 días, 1 administración por día	más 21	0 de 4
V.2-a/V.4-a	20	21 días, 1 administración por día	más 19	0 de 4
V.2-a/V.4-a	40	21 días, 1 administración por día	más 17	0 de 4
V.2-a/V.4-a	80	21 días, 1 administración por día	menos 4	0 de 4
1-4	25	21 días, 2 administraciones por día	más 9	0 de 4
1-4	50	21 días, 2 administraciones por día	más 8	0 de 4
1-4	75	21 días, 2 administraciones por día	más 0	0 de 4
1-4	100	21 días, 2 administraciones por día	más 9	0 de 4
1-4	100	21 días, 1 administración por día	más 13	0 de 4

Por lo tanto, la MTD para un tratamiento de 21 días con una administración por día para los ejemplos

- 1-1: es mayor que 100 mg/kg
- V.1-a/V.3-a: es mayor que 100 mg/kg
- V.2-a/V.4-a: es mayor que 80 mg/kg
- 1-4: es mayor que 100 mg/kg

Por lo tanto, la MTD para un tratamiento de 21 días con dos administraciones por día del Ejemplo 1-4 es mayor que 100 mg/kg.

Eficacia in vivo en el modelo de xenoinjerto PC3 en ratón

Los ejemplos 1-1, V.1-a/V,3-a, 1-2, V.2-a/V.4-a y 1-4 fueron administrados luego a ratones macho desnudos (NMRI nu/nu) en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata PC-3:

- Dosificación: véase la Tabla 8
- Ruta de administración: oral
- Vehículo: PEG400/etanol/Solutol HS 15 (70/5/25, v/v/v)
- Volumen de administración: 10 ml/kg
- Esquema: véase la Tabla 8
- Nº de ratones: véase la Tabla 8

Tabla 8

Sustan- cia	Dosis (mg/k g)	Protocolo	[T/C]	Cambio má- ximo en el peso corpo- ral (%)	Muertes
1-1	80	15 días, 2 ad- ministracio- nes por día	0,34	menos 5	0 de 10

V.1-a/V.3-a	100	14 días, 1 administración por día	0,30	menos 8	0 de 9
V.1-a/V.3-a	100	14 días, 2 administraciones por día	0,15	menos 10	2 de 9
1-2	40	17 días, 2 administraciones por día	0,44	más 0	0 de 9
1-2	80	17 días, 2 administraciones por día	0,28	menos 4	0 de 9
V.2-a/V.4-a	40	20 días, 1 administración por día	0,71	más 5	0 de 9
V.2-a/V.4-a	80	20 días, 1 administración por día	0,44	más 9	0 de 9
V.2-a/V.4-a	80	14 días, 2 administraciones por día	0,27	menos 17	1 de 9
1-4	80	17 días, 2 administraciones por día	0,29	menos 1	0 de 10

La eficacia terapéutica se definió como un valor T/C de <= 0,50. Una buena tolerabilidad se definió como un cambio má-

ximo en el peso corporal de $\leq$ menos 10% y un 100% de supervivencia en los animales de prueba.

Por lo tanto, a una dosis de 80 mg/kg y una administración 2 veces por día, se observó eficacia terapéutica y una buena tolerabilidad para el ejemplo 1-1.

Por lo tanto, a 100 mg/kg y una administración de una vez por día, se observó eficacia terapéutica y una buena tolerabilidad para el ejemplo V.1-a/V.3-a, en tanto se observó eficacia terapéutica, pero no una buena tolerabilidad a una dosis de 100 mg/kg y una administración 2 veces por día.

Por lo tanto, a 40 mg/kg y a 80 mg/kg (con una administración en cada caso de 2 veces por día), se observó eficacia terapéutica y una buena tolerabilidad para el ejemplo 1-2.

Por lo tanto, a 80 mg/kg y una administración de una vez por día, se observó eficacia terapéutica y una buena tolerabilidad para el ejemplo V.2-a/V.4-a, en tanto no se observó eficacia terapéutica a 40 mg/kg y una administración de una vez por día y no se observó una buena tolerabilidad a 80 mg/kg y una administración de 2 veces por día.

Por lo tanto, a una dosis de 80 mg/kg y una administración 2 veces por día, se observó eficacia terapéutica y una buena tolerabilidad para el ejemplo 1-4.

Predicción de los parámetros farmacocinéticos de humanos y de la dosificación terapéutica de humanos

Los parámetros farmacocinéticos (PK) humanos (Tabla 9) se predijeron basado en los parámetros PK *in vivo* obtenidos para ratas (escala de una única especie), teniendo en cuenta las

diferencias interespecíficas en la fracción libre (fu) en el plasma. El AUC (área bajo la curva) eficaz se determinó basado en el perfil de concentración en plasma medida-tiempo de la eficacia *in vivo* en el modelo de tumor PC3 de ratón (ratón nu/nu). La dosificación terapéutica humana se determinó usando la depuración humana predicha (CL), suponiendo un 100% de biodisponibilidad (F = 1) y usando el AUC eficaz en el modelo animal de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$dosificación = AUC \times \frac{fu - ratón}{fu - humano} \times \frac{CL}{F}$$

Tabla 9

Ejem- plo	dosifi- cación (ratón) [mg/kg]	AUC ter. (ra- tón) [mg*h/ l]	fu (ra- tón/ humano)	AUC calc. (humana) [mg*h/l]	CL pred. (humana) (l/h/kg)	Dosifica- ción pred. (humana) [mg/kg]	Do- si- fi- ca- ción pred (hu- mana) [mg/ pa- cien- te]
1-1	80 [2 x por día]	289	4	1155	0,002	1,7	121
V.1-a	100 [1 x	984	6,6	6494	0,003	19,5	1365

	por día] 100 [2 x por día]	1495		9867		30	2072
V.1-b	-	-	-	-	-	-	-
V.1-c	-	-	-	-	-	-	-
1-2	40 [2 x por día] 80 [2 x por día]	66 156	5,4	355 842	0,009	3,2 7,6	223 531
V.2-a	80 [1x por día] 80 [2 x por día]	544 672	7	3737 4702	0,006	24 30	1674 2106
V.2-b	-	-	-	-	-	-	-
V.2-c	-	-	-	-	-	-	-
1-3	-	-	-	-	-	-	-
V.3-a	100 [1 x por día] 100 [2 x por día]	984 1495	6,6	6494 9867	0,003	19,5 30	1365 2072
V.3-b	-	-	-	-	-	-	-
1-4	80 [2 x por día]	712	5,8	4127	0,003	12,4	867
V.4-a	80 [1x por día] 80 [2 x	544 672	7	3737 4702	0,006	24 30	1674 2106

	por día]						
V.4-b	-	-	-	-	-	-	-

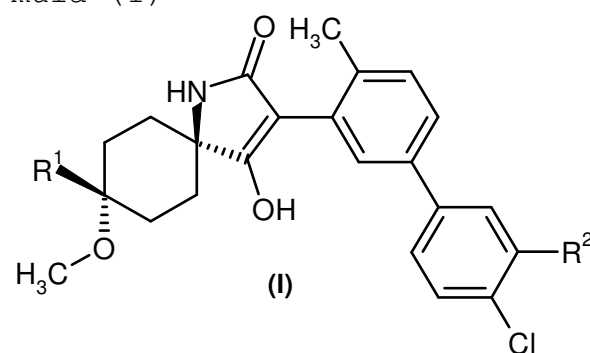
ter. = terapéutico
calc. = calculado
pred. = predicho (corregido para fu)

Figuras:

Figura 1: Expresión de ACC1 en tejido tumoral y en el co-
rrespondiente tejido normal

REIVINDICACIONES:

1. Compuestos, CARACTERIZADOS porque son de la fórmula (I)



en donde

R¹ representa un grupo trifluorometilo o metoximetilo y

R² representa hidrógeno o flúor,

y sus sales.

2. Compuestos, CARACTERIZADOS porque comprenden

- (5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona

- (5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(metoximetil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona

- (5r,8r)-3-(4'-cloro-3'-fluoro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona

- (5r,8r)-3-(4'-cloro-4-metilbifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-8-(trifluorometil)-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona

3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es para su uso como un medicamento.

4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, CA-

RACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

6. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama positivos para receptores hormonales o carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos.

7. Uso de un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque es para preparar un medicamento.

8. Uso de un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque es para preparar un medicamento para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque es para preparar un medicamento para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque es para preparar un medicamento para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama positivos para receptores hormonales o carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos.

11. Uso de un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de trastornos de humanos u otros mamíferos.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de trastornos neoplásicos.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama, carcinomas colorrectales, carcinomas de próstata o carcinomas bronquiales de células no pequeñas.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque es para la profilaxis y/o terapia de carcinomas de mama positivos para receptores hormonales o carcinomas de próstata negativos para receptores de andrógenos.

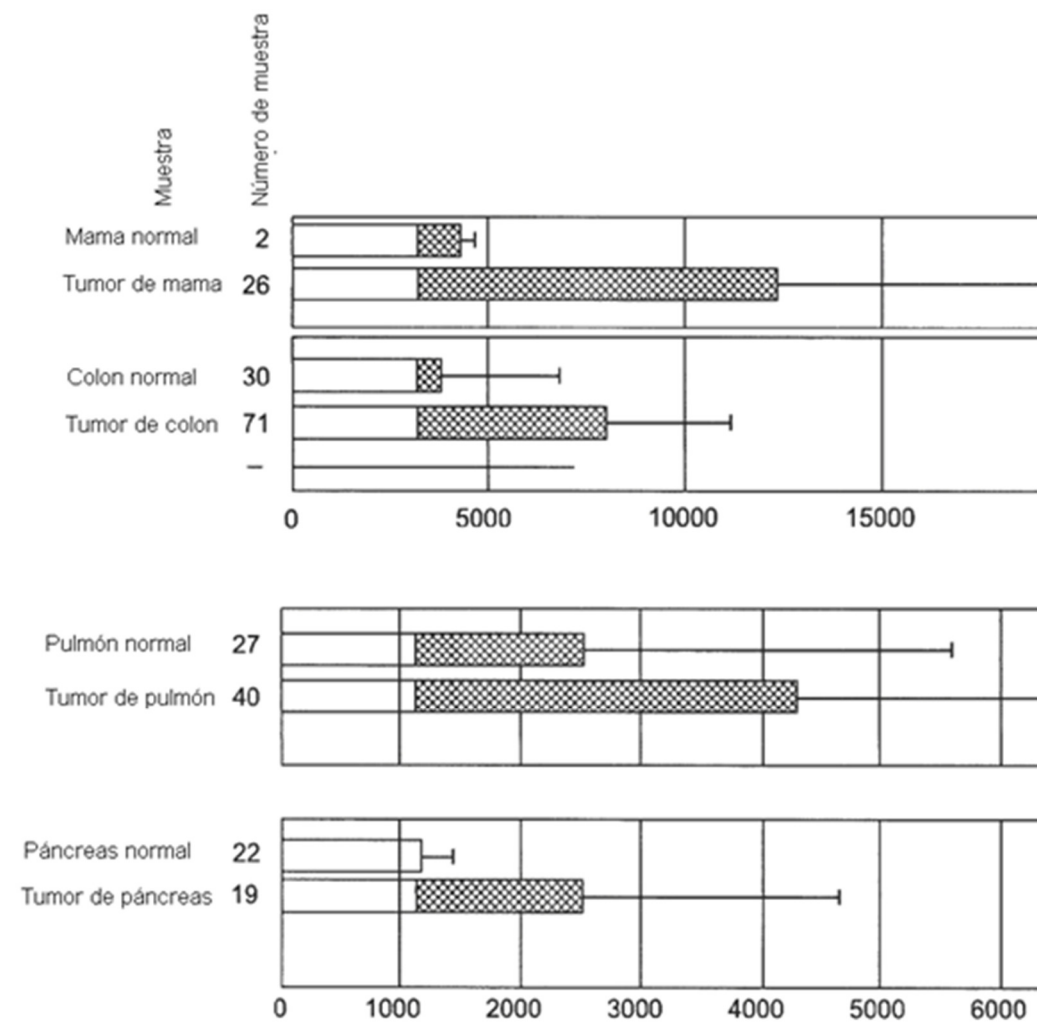
15. Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se combina con otro compuesto activo adicional.

16. Una formulación farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1.

**3-(BIFENIL-3-IL)-4-HIDROXI-8-METOXI-1-AZAESPIRO[4.5]DEC-3-
EN-2-ONAS SUSTITUIDAS**

RESUMEN

Compuestos de 3-(bifenil-3-il)-4-hidroxi-8-metoxi-1-azaespiro[4.5]dec-3-en-2-onas sustituidas, en particular para fines terapéuticos, composiciones farmacéuticas y su uso en terapias, en particular para la profilaxis y terapia de trastornos neoplásicos.



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts BHC113050-WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Formblatt PCT/ISA/220 sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2012/064974	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/07/2012	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/08/2011
Anmelder BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** beruht die internationale Recherche auf

☒

der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde

☐

einer Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache _____, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (Regeln 12.3 a) und 23.1 b)).

b. ☐

Dieser internationale Recherchenbericht wurde erstellt unter Berücksichtigung der **Berichtigung eines offensichtlichen Fehlers**, die nach Regel 91 von dieser Behörde genehmigt wurde bzw. dieser Behörde mitgeteilt wurde (Regel 43.6 bis. (a)).

c. ☐

Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** siehe Feld Nr. I.

2. ☐

Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld Nr. II).

3. ☐

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld Nr. III).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2 in der in Feld Nr. IV angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann dieser Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Hinsichtlich der **Zeichnungen**

a. ist folgende Abbildung der **Zeichnungen** mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐

wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐

wie von der Behörde ausgewählt, weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐

wie von der Behörde ausgewählt, weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

b. ☒

wird keine der Abbildungen mit der Zusammenfassung veröffentlicht.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07D209/54 A61K31/403 A61P35/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07D A61K A61P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MATTHEW P BOURBEAU ET AL: "Chapter 6 Recent Advances in Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", ANNUAL REPORTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, SAN DIEGO, US, Bd. 45, 1. Januar 2010 (2010-01-01), Seiten 95-108, XP008149459, ISSN: 0065-7743, DOI: 10.1016/S0065-7743(10)45006-X [gefunden am 2010-10-13] das ganze Dokument	1-16
A	WO 2010/063378 A1 (BAYER CROPSCIENCE AG [DE]; FISCHER REINER [DE]; LEHR STEFAN [DE]; DITT) 10. Juni 2010 (2010-06-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/-	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. August 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/08/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Skulj, Primoz

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JEAN WENGER ET AL: "Chapter 9. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors", 23. Februar 2007 (2007-02-23), MODERN CROP PROTECTION COMPOUNDS, WILEY.VCH, USA, PAGE(S) 335 - 357, XP008149458, ISBN: 978-3-527-31496-6 [gefunden am 2008-02-05] das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/064974

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2010063378	A1	10-06-2010	AU	2009321813	A1	23-06-2011		
			CA	2745006	A1	10-06-2010		
			CN	102239145	A	09-11-2011		
			CO	6361850	A2	20-01-2012		
			CU	20110124	A7	31-01-2012		
			DO	P2011000162	A	30-06-2011		
			EC	SP11011092	A	30-06-2011		
			EP	2373619	A1	12-10-2011		
			JP	2012510482	A	10-05-2012		
			KR	20110095912	A	25-08-2011		
			MA	32835	B1	01-11-2011		
			SG	171827	A1	28-07-2011		
			US	2010261608	A1	14-10-2010		
			WO	2010063378	A1	10-06-2010		
