

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

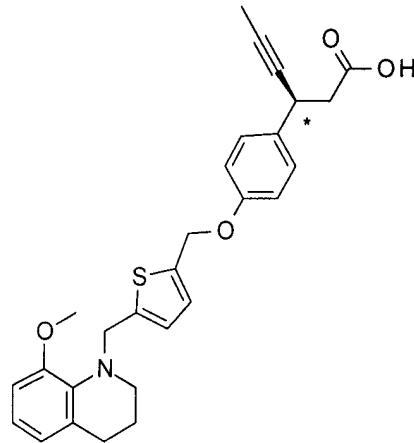
(11) N° de publication : **MA 35351 B1**
(51) Cl. internationale : **C07D 409/06; A61K 31/381;
A61K 31/4709**
(43) Date de publication : **01.08.2014**

(21) N° Dépôt : **36755**
(22) Date de Dépôt : **13.02.2014**
(30) Données de Priorité : **17.08.2011 US 61/524,462**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2012/050051 09.08.2012**
(71) Demandeur(s) : **ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center Indianapolis Indiana 46285 (US)**
(72) Inventeur(s) : **HAMDOUCHI, Chafiq**
(74) Mandataire : **H&H CONSULTING LAW FIRM**

(54) Titre : **NOUVEAU DÉRIVÉ 1,2,3,4- TÉTRAHYDROQUINOLÉINE UTILE POUR LE TRAITEMENT DU DIABÈTE.**
(57) Abrégé : La présente invention concerne un composé de la formule ci-dessous ou un sel pharmaceutique de celui-ci, des méthodes de traitement du diabète utilisant le composé ainsi qu'un procédé de préparation du composé.

ABREGE

La présente invention propose un composé de la formule ci-dessous



- 5 ou un sel pharmaceutique de celui-ci, des méthodes de traitement du diabète utilisant le composé et un procédé de préparation du composé.

3736A
01 AOUT 2014

NOUVEAU DÉRIVÉ 1,2,3,4-TÉTRAHYDROQUINOLÉINE UTILE POUR LE TRAITEMENT DU DIABÈTE

5 Le diabète est un problème de santé sérieux pour le monde en
développement. Il serait souhaitable de fournir un traitement oral sûr et efficace
pour le diabète. Certains traitements oraux efficaces disponibles dans le
commerce pour le diabète de type deux (DT2) sont supposés agir par la
modulation du récepteur gamma récepteur activé par les proliférateurs des
10 peroxyosomes (PPAR). L'administration de ces médicaments a été associée à
des effets indésirables non souhaités qui incluent parfois une hypoglycémie,
des lésions du foie, une maladie gastro-intestinale, une prise de poids, ou
d'autres effets indésirables qui peuvent être associés à l'activité de PPAR
gamma. De nouvelles options de traitement qui offrent un profil de sécurité plus
15 souhaitable pour la prise en charge du DT2 sont souhaitées afin de traiter ou de
prévenir le diabète chez davantage de patients. En particulier, de nouvelles
méthodes de traitement fondées sur un mécanisme qui peuvent réduire au
minimum ou éviter les effets qui ont été associés à l'activation de PPAR gamma
sont particulièrement souhaitables.

20 Le récepteur 40 couplé à la protéine G (GPR-40), également connu sous
le nom de récepteur 1 des acides gras libres (FFA1 ou FFAR1 pour « Free
Fatty Acid Receptor 1 »), est signalé comme principalement exprimé à des taux
élevés dans les cellules pancréatiques bêta de rongeurs, les lignées cellulaires
d'insulinome, et les îlots humains. Ce récepteur est activé par les acides gras à
25 chaînes moyennes et longues. La dépendance au glucose de la sécrétion
d'insuline est une caractéristique importante de l'activation de GPR-40, faisant
de ce récepteur une excellente cible pour le développement de thérapies
efficaces avec un profil de sécurité souhaité pour une utilisation dans le
traitement du DT2. Des composés qui offrent une efficacité et un profil de
30 sécurité plus souhaitable par rapport aux thérapies existantes telles que
l'insuline et les sulfonyles peuvent être particulièrement souhaitables.

La présente invention propose également une composition pharmaceutique comprenant un composé de formule I tel que décrit ci-dessus ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci conjointement avec un ou plusieurs supports, diluants ou excipients pharmaceutiquement acceptables.

5 La présente invention propose également une composition pharmaceutique comprenant un composé de formule I tel que décrit ci-dessus ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci conjointement avec un ou plusieurs supports, diluants ou excipients pharmaceutiquement acceptables, et éventuellement un ou plusieurs agents thérapeutiques.

10 La présente invention propose également une méthode pour traiter le diabète chez un mammifère. La méthode comprend l'administration au mammifère ayant besoin d'un traitement, d'un composé tel que décrit ci-dessus pour la formule I, ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci. Plus
15 préférablement, la présente invention fournit une méthode de traitement du diabète de type II chez un mammifère ayant besoin d'un traitement par l'administration au mammifère d'un composé tel que décrit ci-dessus pour la formule I ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci. De préférence, le mammifère est un humain.

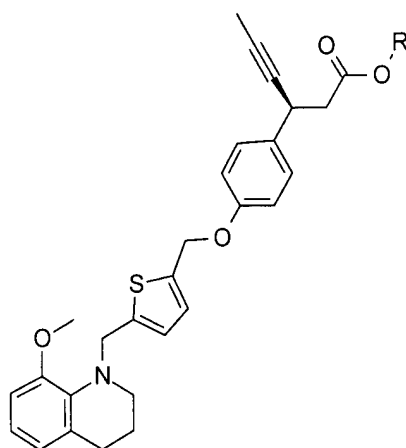
20 La présente invention propose également une méthode pour traiter le diabète chez un mammifère par l'administration au mammifère ayant besoin d'un traitement, d'une composition pharmaceutique comprenant un composé tel que décrit ci-dessus pour la formule I, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci. Plus préférablement, la présente invention fournit une
25 méthode de traitement du diabète de type II chez un mammifère ayant besoin d'un traitement par l'administration au mammifère d'une composition pharmaceutique comprenant un composé tel que décrit ci-dessus pour la formule I, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci. De préférence, le mammifère est un humain.

30 La présente invention propose un composé selon la formule I ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci tel que décrit ci-dessus pour une utilisation en thérapie.

Dans encore une autre forme, la présente invention propose un composé tel que décrit ci-dessus selon la formule I, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou une composition pharmaceutique pour une utilisation dans le traitement du diabète chez un mammifère en ayant besoin. De
5 préférence, l'utilisation est destinée au traitement du diabète de type II et le mammifère est un humain.

La présente invention propose l'utilisation d'un composé selon la formule I, ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement du diabète. De préférence, le
10 médicament est destiné au traitement du diabète de type II et au traitement des mammifères en particulier, des humains.

Dans encore une autre forme, la présente invention propose un composé intermédiaire de la formule II



15

II.

dans laquelle R est choisi parmi un groupe alkyle en C₁₋₄, halogénoalkyle en C₁₋₄, cycloalkyle en C₃₋₆, alkyl en C₁₋₄-cycloalkyle en C₃₋₆, phényle, et alkylphényle en C₁₋₅ pour fournir un composé de formule I, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci. Les groupes R préférés incluent un groupe alkyle en C₁₋₂, halogénoalkyle en C₁₋₂, phényle, et alkylphényle en C₁₋₂. Les groupes R
20 particulièrement appréciés incluent le méthyle, l'éthyle, le phényle, et le benzyle.

La présente invention propose également un procédé de préparation de l'acide (3S)-3-[4-[[5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-

thiényl]méthoxy]phényl]hex-4-ynoïque décrit ci-dessus pour la formule I. Le procédé comprend la déprotection ou la dé-estérification du composé intermédiaire selon la formule II, pour préparer le composé de formule 1 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

5 L'homme de l'art peut aisément comprendre et être capable de mettre en œuvre des réactions de déprotection sans expérimentation excessive. Il sera reconnu par l'homme de l'art que, en plus de l'acide carboxylique et de l'acide carboxylique protégé, d'autres groupes fonctionnels qui peuvent être facilement convertis en un acide carboxylique peuvent être utilisés à la place de l'acide
10 carboxylique ou de l'acide protégé. Ces groupes fonctionnels, préparations, et transformations de ces groupes en acides carboxyliques peuvent être trouvés dans « Comprehensive Organic Transformations : A Guide to Functional Group Preparations » de Larock. R.C, Wiley VCH, 1999 et dans « March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure » Smith, M.B., et
15 March, J., Wiley-Interscience, 6^{ème} Ed. 2007.

Le composé selon la présente invention, l'acide (3S)-3-[4-[[5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-thiényl]méthoxy]phényl]hex-4-ynoïque, peut être fourni sous la forme d'un sel pharmaceutiquement acceptable. « Sel pharmaceutiquement acceptable » fait référence aux sels du
20 composé selon l'invention considérés comme acceptables pour un usage clinique et/ou vétérinaire. Les sels pharmaceutiquement acceptables et la méthodologie courante pour les préparer sont bien connus dans l'art. Voir, par exemple, P. Stahl, *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Salts : Properties, Selection and Use, (VCH/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*,
25 « Pharmaceutical Salts, » *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, janvier 1977.

L'expression « support, diluant, ou excipients pharmaceutiquement acceptables », signifie que le support, le diluant, et les excipients sont pharmaceutiquement compatibles avec les autres ingrédients de la
30 composition.

Certains substituants ont été supprimés des schémas suivants pour des raisons de clarté et ceci n'est pas destiné à limiter l'enseignement des schémas

d'une quelconque façon. En outre, les isomères, les énantiomères, ou les diastéréoisomères individuels, peuvent être séparés à n'importe quel moment approprié dans la synthèse du composé de formule I par des procédés tels que la chromatographie chirale. De plus, les intermédiaires décrits dans les schémas et les préparations qui suivent contiennent un certain nombre de groupes protecteurs d'azote, d'hydroxy, et d'acide tels que des esters. Le groupe protecteur variable peut être identique ou différent à chaque occurrence, selon les conditions de réaction particulières et les transformations spécifiques à réaliser. Les conditions de protection et de déprotection sont bien connues de l'homme du métier et sont décrites dans la littérature. Voir, par exemple, Greene et Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (T. Greene et P. Wuts, éd., 2^{ème} éd., 1991).

Les abréviations utilisées ici sont définies selon *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, n° 1, 1984. D'autres abréviations sont définies comme suit : « ADDP » désigne la 1-(azodicarbonyl)dipipéridine ; « BSA » désigne la sérumalbumine bovine ; « DIBAL-H » désigne l'hydrure de diisobutylaluminium ; « DIPEA » désigne la diisopropyléthylamine ; « DMEM » désigne le milieu de Eagle modifié par Dulbecco ; « DTT » désigne le dithiothréitol ; « ESI » désigne l'ionisation par électronébulisation ; « EtOAc » désigne l'acétate d'éthyle ; « EtOH » désigne l'alcool éthylique ou éthanol ; « F12 » désigne le milieu F12 de Ham ; « FBS » désigne le sérum embryonnaire de veau ; « HEK » désigne le rein embryonnaire humain ; « Cl_{50} » désigne la concentration d'un agent qui produit 50 % de la réponse inhibitrice maximale possible pour cet agent ; « MeOH » désigne l'alcool méthylique ou méthanol ; « NBS » désigne le N-bromosuccinimide ; « PPAR » désigne le récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes ; « PPRE » désigne l'élément de réponse aux proliférateurs des peroxysomes ; « RFU » désigne l'unité de fluorescence relative ; « RPMI » désigne le Roswell Park Memorial Institute ; « TA » fait référence à la température ambiante ; « THF » désigne le tétrahydrofurane ; et « TK » désigne la thymidine kinase.

Le terme alkyle tel qu'il est utilisé ici est un groupe alkyle à chaîne linéaire tel que l'éthyle ou le n-propyle, ou un groupe alkyle à chaîne ramifiée tel

que l'isopropyle ou le *tert*-butyle. Le terme halogénogénoalkyle en C₁₋₄, désigne un groupe alkyle qui possède 1, 2, 3 groupes halogéno ou plus, fixés aux atomes de carbone de la chaîne alkyle. S'il existe deux atomes d'halogène ou plus, les atomes d'halogène ne nécessitent pas être fixés au même atome de

5 carbone. Ce terme inclut également les groupes perhalogéno alkyles où tous les atomes d'hydrogène du groupe alkyle sont remplacés par un atome d'halogène.

Dans les schémas ci-dessous, tous les substituants, sauf indication contraire, sont tels que définis précédemment. Les réactifs et les matières

10 premières sont en général facilement accessibles à l'homme de l'art. D'autres peuvent être préparés par des techniques classiques de chimie organique et hétérocyclique, qui sont analogues aux synthèses des composés connus structurellement semblables, et les procédures suivantes décrites dans les préparations et les exemples, y compris les procédures nouvelles.

Schéma 1

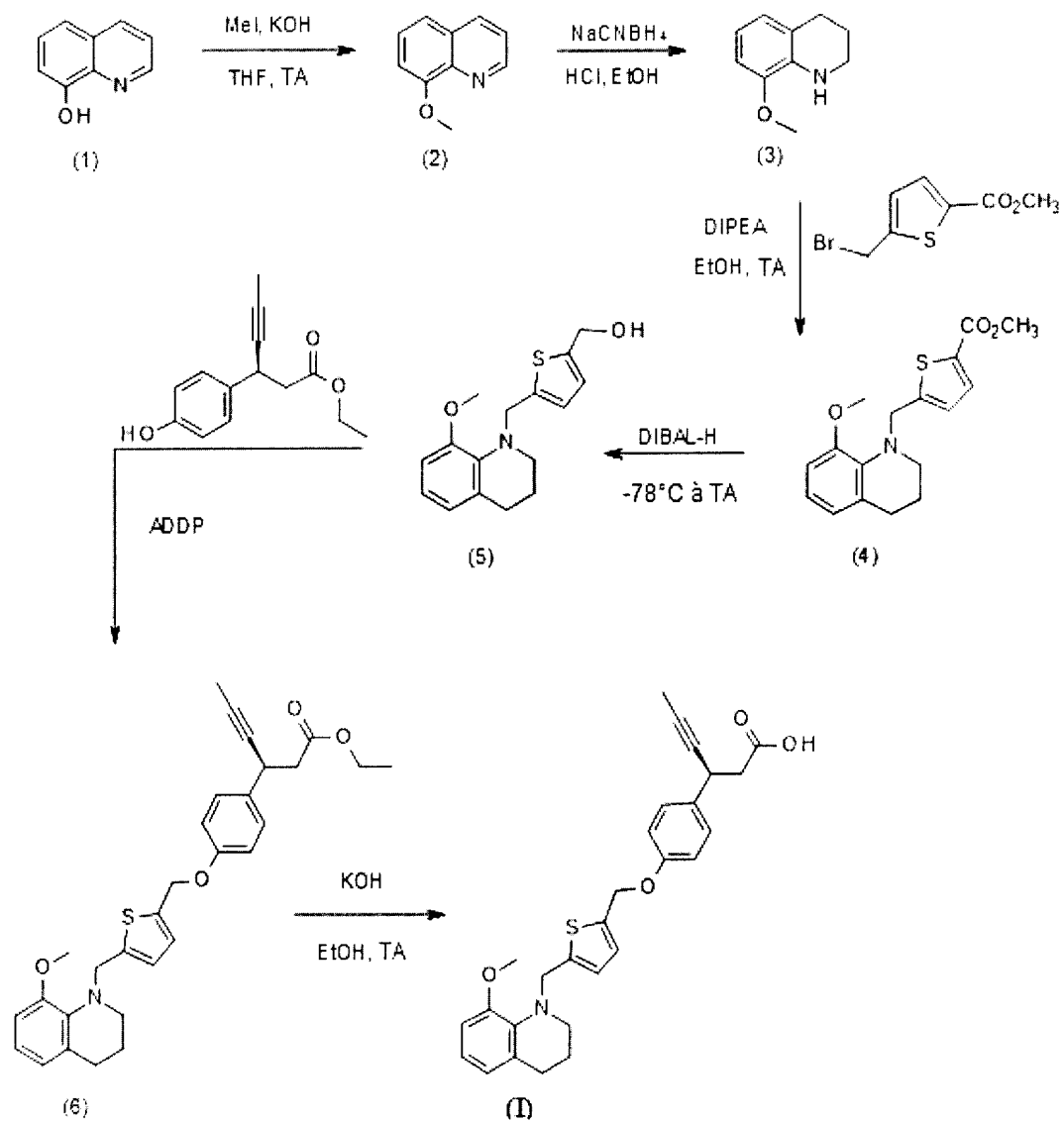
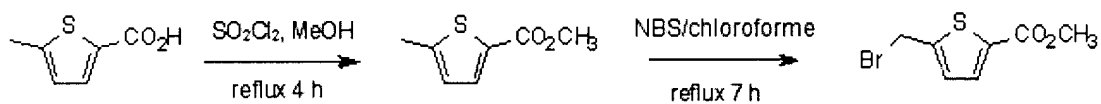


Schéma 2



Préparations et exemples

Les préparations et exemples suivants illustrent davantage l'invention et représentent une synthèse typique du composé de formule (I). Les composés sont nommés selon l'IUPACNAME ACDLABS ou Symyx Draw 3.2.

5

Préparation 1

8-méthoxy-quinoléine

Ajouter de l'hydroxyde de potassium (435 g, 7,76 moles) à une solution de 8-hydroxy quinoléine (250 g, 1,724 moles) dans du THF (10 l) à la température ambiante et agiter. Ajouter de l'iodure de méthyle (435 g, 2,58 moles) goutte à goutte et agiter durant une nuit. Filtrer le mélange réactionnel et laver le solide avec du THF (2 l). Concentrer la solution à siccité ; ajouter de l'eau ; extraire avec du dichlorométhane (2 x 3 l) ; combiner les couches organiques ; et laver avec de la saumure. Recueillir les couches organiques et sécher sur du sulfate de sodium. Éliminer les matières solides par filtration. Recueillir le filtrat et concentrer sous pression réduite pour donner une huile rouge, qui se solidifie au repos, pour donner le composé indiqué en titre (281 g, 102 %), qui peut être utilisé sans autre purification. ESI (m/z) 160 (M+H).

20

Préparation 2

8-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroquinoléine

Ajouter du cyanoborohydrure de sodium (505 g, 8,11 moles) dans de l'EtOH (1 l) à une solution de 8-méthoxy quinoléine (425 g, 2,673 moles) dans de l'EtOH (9 l), et mélanger. Refroidir le mélange réactionnel à une température interne de 0°C et ajouter de l'HCl (35 %, 1,12 l, 10,962 moles) goutte à goutte en 60 min afin que la température interne ne s'élève pas au-dessus de 20°C. Laisser le mélange réactionnel réchauffer à température ambiante et ensuite chauffer à reflux pendant 2,5 heures. Refroidir à la température ambiante et agiter pendant une nuit. Ajouter de l'hydroxyde d'ammonium (25 %, 1 l) ; diluer avec de l'eau (15 l) ; et extraire le mélange avec du dichlorométhane (3 x 10 l). Combiner les couches organiques et sécher sur du sulfate de sodium. Éliminer les matières solides par filtration. Recueillir le filtrat et concentrer sous pression

30

réduite pour donner un résidu. Purifier le résidu par une chromatographie éclair sur du gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle:hexane (1:10) pour donner le composé indiqué en titre (357 g, 82 %). ESI (m/z) 164 (M+H).

Préparation 3

5 Méthyl-5-méthylthiophène-2-carboxylate

Ajouter du chlorure de thionyle (153 ml, 2,1 moles) goutte à goutte en 20 min à une solution d'acide 5-méthylthiophène-2-carboxylique (100 g, 0,703 mole) dans du MeOH (1 l) à 0°C et mélanger. Après que l'ajout soit terminé, chauffer le mélange réactionnel à reflux pendant 3,5 heures. Refroidir et concentrer sous vide pour donner une huile épaisse. Diluer l'huile avec de l'EtOAc (500 ml) et laver de manière séquentielle avec de l'eau (300 ml) puis de la saumure (300 ml). Sécher la couche organique sur du sulfate de sodium. Éliminer les matières solides par filtration. Recueillir le filtrat et concentrer sous pression réduite pour donner le composé indiqué en titre (106 g, 97 %), qui est
10
15 utilisé sans autre purification. ESI (m/z) 156 (M+H).

Préparation 4

5-(bromométhyl)thiophène-2-carboxylate de méthyle

Ajouter du NBS fraîchement recristallisé (323,8 g, 1,81 moles) à une solution de méthyl-5-méthylthiophène-2-carboxylate (258 g, 1,65 moles) dans du chloroforme (2,6 l) à température ambiante, et agiter. Ajouter du peroxyde de benzoyle (3,99 g, 0,016 mole) et chauffer le mélange réactionnel à reflux pendant 7 heures. Refroidir le mélange réactionnel à la température ambiante et filtrer à travers de la terre de diatomées. Laver le gâteau de filtration avec du chloroforme (250 ml). Recueillir les couches organiques et éliminer le solvant
20
25 pour donner le composé indiqué en titre (388 g, 100 %), qui est utilisé sans autre purification. ESI (m/z) 236 (M+H).

Préparation 5

Méthyl-5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]thiophène-2-carboxylate

30 Ajouter du méthyl-5-(bromoéthyl)thiophène-2-carboxylate (432,5 g, 1,84 moles) dans de l'EtOH (500 ml) à une solution de 8-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroquinoléine (300 g, 1,84 moles) dans de l'EtOH (1 l) et agiter. Ajouter

de la DIPEA (641 ml, 3,67 moles) goutte à goutte et agiter à température ambiante pendant une nuit. À l'issue de la réaction, éliminer l'EtOH sous vide, et ajouter de l'eau (5 l). Extraire la phase aqueuse avec de l'EtOAc (3 x 3 l) ; combiner les couches organiques ; et sécher sur du sulfate de sodium. Filtrer la solution et concentrer sous pression réduite pour donner un résidu. Purifier le résidu par une chromatographie éclair sur du gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle:hexane (6:94) pour donner le composé indiqué en titre (325 g, 56 %). ESI (m/z) 318 (M+H).

Préparation 6

10 [5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-thiényl]méthanol

Ajouter du DIBAL-H (1 M dans du toluène 2,7 l, 2,66 moles) lentement par l'intermédiaire d'une canule sur une période de 1,5 h à une solution sous agitation de méthyl-5-(8-méthoxy-3,4-dihydroquinoléin-1(2H)-yl)méthyl)thiophène-2-carboxylate (281 g, 0,886 mole) dans du THF (4 l) à -70°C. Surveiller la réaction par une chromatographie sur couche mince (CCM) pour l'achèvement. À l'issue de la réaction, laisser le mélange réactionnel réchauffer à 20°C et ajouter une solution saturée de chlorure d'ammonium. Ajouter une solution de tartrate de sodium et potassium (1,3 kg dans 5 l d'eau), et agiter pendant une nuit. Séparer la couche organique ; extraire la phase aqueuse avec de l'EtOAc (2 x 5 l) ; puis combiner les couches organiques ; et sécher les couches organiques combinées sur du sulfate de sodium. Éliminer les matières solides par filtration. Éliminer le solvant du filtrat sous pression réduite pour donner le composé indiqué en titre sous la forme d'un solide blanc (252 g, 98 %). ESI (m/z) 290 (M+H).

25 **Préparation 7**

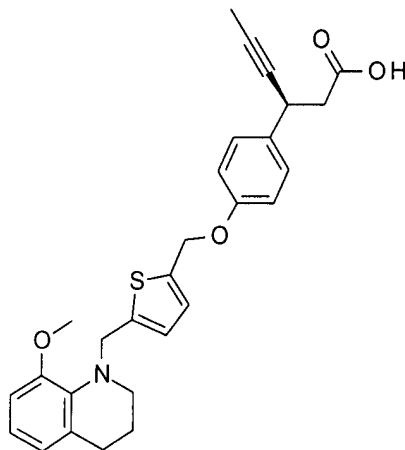
(3S)-3-[4-[[5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-thiényl]méthoxy]phényl]hex-4-ynoate d'éthyle

Ajouter de la tributylphosphine (solution à 50 % dans de l'EtOAc, 543 ml, 1,34 mole) à une solution d'ADDP (282,5 g, 1,5 éq) dans du THF (3 l) et refroidir le mélange à une température interne de 0°C, puis agiter pendant 15 minutes. Ajouter du 3-(4-hydroxy-phényl)hex-4-ynoate de (S)-éthyle (173,5 g, 0,747 mole) dans du THF (3 l) goutte à goutte en 15 min ; puis ajouter

du 5-((8-méthoxy-3,4-dihydroquinoléin-1(2H)-yl)méthyl)thiophène-2-yl)méthanol (216 g, 0,747 mole) dans du THF (5 l) goutte à goutte. Laisser le mélange réactionnel réchauffer à la température ambiante et agiter pendant une nuit. Filtrer le mélange réactionnel sur de la terre de diatomées et laver le gâteau de filtration avec de l'acétate d'éthyle (2 l). Concentrer le filtrat organique à siccité. Ajouter de l'eau (4 l) ; extraire avec de l'acétate d'éthyle (3 x 5 l) ; combiner les couches organiques ; et sécher les couches organiques combinées sur du sulfate de sodium. Éliminer les matières solides par filtration et concentrer sous pression réduite pour donner une huile. Purifier le résidu par une chromatographie éclair sur du gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle:hexane (6:94) pour donner le composé indiqué en titre (167 g, 44 %). ESI (m/z) 504 (M+H).

Exemple 1

Acide (3S)-3-[4-[[5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-thiényl]méthoxy]phényl]hex-4-ynoïque



Ajouter une solution d'hydroxyde de potassium (49,76 g, 0,88 mole) dans de l'eau (372 ml) à une solution de (S)-éthyl-3-(4-((5-8-méthoxy-3,4-dihydroquinoléin-1(2H)-yl)méthyl)thiophén-2-yl)méthoxy)phényl)hex-4-ynoate (149 g, 0,296 mole) dans de l'EtOH (1,49 l) à la température ambiante et agiter pendant une nuit. Concentrer le mélange réactionnel à siccité et ajouter de l'eau (1,3 l). Extraire la solution résultante avec de l'EtOAc (2 x 300 ml) et séparer. Ajuster le pH de la couche aqueuse à pH = 6 avec de l'HCl 2 N. Recueillir les matières solides résultantes. Recristalliser les matières solides à partir de

MeOH chaud (298 ml, 2 volumes) pour donner le composé indiqué en titre (91 g, 65 %). ESI (m/z) 476 (M+H).

GPR40 : Informations

- 5 Les résultats des études utilisant des souris transgéniques sur-exprimant le gène GPR40 humain sous le contrôle du promoteur de l'insuline II récemment rapportées par Nagasumi soutiennent en outre que GPR40 joue un rôle important dans la régulation de la GDIS et des taux de glucose plasmatique *in vivo*, en particulier dans des modèles de rongeurs de résistance à l'insuline.
- 10 Nagasumi K, et. al., *Overexpression of GPR40 in pancreatic β -cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice*, **Diabetes** 58: 1067-1076, 2009. Voir aussi, Briscoe CP et al., *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*, **Journal Biological Chemistry** 278: 11303 – 11311, 2003.
- 15 Ces résultats soutiennent en outre que la mise au point de nouveaux composés modulateurs de GPR40 peut être particulièrement souhaitable pour une utilisation dans le traitement du DT2.

Dosage primaire du flux de calcium

- 20 Le composé de l'exemple 1 est testé sensiblement comme décrit ci-dessous et présente une valeur de CE₅₀ pour le dosage primaire du flux de calcium inférieure à 1 μ M.

- Ce dosage est utilisé pour cribler des composés en mesurant l'augmentation des taux de calcium intracellulaire qui résultent lorsqu'un ligand se lie et active le GPR40, démontrant ainsi la puissance et l'efficacité des
- 25 agonistes de GPR40. Des cellules HEK293 surexprimant l'ADNc du GPR40 humain, maintenues dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco avec du milieu F12 dans un rapport de 3:1, enrichi avec 10 % de FBS et 800 μ g/ml de généticine à 37°C et 5 % de CO₂ sont utilisées pour l'étude. Les dosages des
- 30 agonistes sont effectués en utilisant une trousse de dosage Calcium 4 Dye (Molecular Devices) en présence de 0,1 % de BSA sans acide gras dans le tampon d'essai (HBSS 1x (solution saline équilibrée de Hank) et 20 mM

d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique). L'activation du récepteur est mesurée comme étant une augmentation du calcium intracellulaire en utilisant un lecteur de plaque d'imagerie fluorométrique (FLIPR). La variation maximale de la fluorescence par rapport à la ligne de base est utilisée pour déterminer la réponse à l'agoniste. Une valeur de CE₅₀ (concentration efficace à la moitié de la réponse maximale) du composé est calculée à l'aide du logiciel Excel Fit (version 4 ; IDBS) en traçant la concentration vs les unités de fluorescence relatives (RFU). Le pourcentage d'efficacité est calculé sur la base de la réponse maximale présentée par le composé par rapport au ligand naturel, l'acide linoléique. Le composé à tester de l'exemple 1 a une CE₅₀ de 152 +/- 52 nM avec 84 +/- 24 % d'efficacité quand on l'examine dans ce dosage. Ces résultats démontrent en outre la puissance et l'efficacité souhaitées de ce composé comme agoniste de GPR40.

15 **Dosages de la sécrétion d'insuline dépendante du glucose (GDIS)**

Étant donné que l'activation de GPR40 est connue pour entraîner la sécrétion d'insuline, laquelle est fonction des concentrations élevées en glucose, deux systèmes de dosage distincts (une lignée de cellules d'insulinome et des îlots primaires de rongeurs) sont mis au point pour caractériser davantage les composés qui sont connus pour augmenter le calcium intracellulaire dans le dosage primaire de GPR40 commenté ci-dessus.

Les dosages de la GDIS sont effectués en utilisant la lignée cellulaire d'insulinome de souris Min6. Les cellules Min6 sont maintenues dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant des acides aminés non essentiels, 10% de FBS, 50 mM de 2-mercaptoéthanol et 1 % de pénicilline et de streptomycine à 37°C plus 5 % de CO₂. Le jour de l'expérience, les cellules sont lavées à deux reprises avec 200 µl de tampon de Krebs-Ringer préalablement chauffé sans glucose. L'ajout de 200 µl de tampon de Krebs-Ringer préalablement chauffé contenant 2,5 mM de glucose est utilisé pour priver les cellules, suivi de l'ajout des composés en présence d'une concentration élevée de glucose (25 mM). La plaque est incubée à 37°C pendant 2 heures. À la fin de l'incubation de 2 h, le surnageant est transféré

doucement dans une plaque de filtration Millipore et centrifugé à 200 g (force de gravité) pendant 3 minutes. L'insuline est dosée à l'aide d'une trousse d'estimation Mercodia Insulin. L'ajout de l'exemple 1 à raison de 0,01, 0,1, 1,0, et 10,0 μM , plus 25 mM de glucose aux cellules Min6 a entraîné une
5 augmentation dépendante de la dose de la sécrétion d'insuline avec une augmentation statistiquement significative ($P < 0,01$) (2,68 fois par rapport à celle obtenue avec 25 mM de glucose) à la dose de 1,0 μM .

Des dosages de la GDIS utilisant des îlots pancréatiques de Langerhans primaires de rongeurs sont également utilisés pour caractériser le composé
10 d'illustration. Les îlots pancréatiques sont isolés de rats SD (Sprague Dawley) mâles par digestion à la collagénase et séparation par un gradient densité Histopaque. Les îlots sont cultivées pendant une nuit dans du milieu RPMI-1640 avec du GlutaMAXn (forme dipeptidique de la L-glutamine, stabilisée (n° de catalogue Invitrogen 61870-010)) pour faciliter la récupération à partir du
15 procédé d'isolement. La sécrétion d'insuline est déterminée par une incubation de 90 minutes dans du tampon EBSS (solution saline équilibrée de Earle) dans une plaque de 48 puits. En bref, les îlots sont d'abord pré-incubés dans de l'EBSS avec 2,8 mM de glucose pendant 30 min, et sont ensuite transférés dans une plaque de 48 puits (quatre îlots/puits) contenant 150 μl de glucose
20 2,8 mM, et incubés avec 150 μl d'EBSS avec 2,8 ou 11,2 mM de glucose en présence ou en absence du composé à tester pendant 90 minutes. Le tampon est retiré des puits à la fin de l'incubation, et analysé pour déterminer les taux d'insuline en utilisant la trousse ELISA Rat Insulin (Mercodia). Dans ce système de dosage, l'incubation de l'exemple 1 à raison de 1, 3, et 10 μM avec des îlots
25 de rat et 11,2 mM de glucose entraîne une augmentation statistiquement significative ($P < 0,05$) de l'insuline à 3,0 μM (2,1 fois) par rapport à celle obtenue avec 11,2 mM de glucose. Ainsi, le composé de l'exemple 1 induit la production d'insuline dans les conditions de ce dosage.

Essais de sélectivité :**Essais fonctionnels et essais de liaison aux récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) α , δ , et γ :**

Étant donné que GPR40 est connu pour être activé par les ligands de PPAR γ , le composé d'illustration est étudié dans des essais fonctionnels et des essais de liaison à PPAR α , PPAR δ , et PPAR γ afin de déterminer la sélectivité du composé de l'exemple 1 pour GPR40. Le composé de l'exemple 1 est testé sensiblement comme décrit ci-dessous pour la liaison à PPAR et il présente des valeurs de liaison supérieures à 1 000 nM avec des concentrations de 10 μ M du composé à tester, et est donc considéré comme négatif pour l'activité PPAR.

Les affinités de liaison du composé pour les récepteurs PPAR α , δ , et γ sont évaluées à l'aide de la technologie d'essai par scintillation de proximité (SPA pour « Scintillation Proximity Assay »). Un oligonucléotide biotinylé Direct Repeat 2 (DR2) est utilisé pour la liaison des récepteurs à des billes de SPA enrobées de streptavidine silicate d'yttrium. PPAR α , δ , γ et le récepteur X des rétinoïdes (RXR) de type α sont surexprimés dans les cellules HEK293, et des lysats cellulaires contenant les récepteurs spécifiques sont utilisés dans les essais individuels. Le DR2 est fixé aux billes de SPA sur une période de 30 minutes dans un tampon de liaison contenant 10 mM d'HEPES pH 7,8, 80 mM de KCl, 0,5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 0,5 % d'acide 3[[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-propanesulfonique (CHAPS), et 4,4 % de sérum bovin. Les lysats cellulaires sont incubés dans chaque puits avec l'une des 11 concentrations de composé en présence d'un composé de référence double agoniste de PPAR α/δ radio-marqué (~ 0,033,8 μ Ci de ³H) (acide butanoïque, 2-[4-[2-[[[(2,4-difluorophényl)amino]carbonyl]heptylamino]éthyl]phénoxy]-2-méthyle, voir Burris T.P. et al., *Molecular Pharmacology* 2005, **67**, (3) 948-954) pour les essais sur les récepteurs alpha et delta et un composé de référence agoniste de PPAR γ radio-marqué (~ 0,037,3 μ Ci de ³H) (acide propanoïque, 2-méthyl-2-[4-[3-[propyl[[5-(2-pyridinyl)-2-thiényl]sulfonyl]amino]propyl]phénoxy] voir Burris T.P. et al., *Molecular Pharmacology* 2005, **67**, (3) 948-954) pour les essais sur les récepteurs gamma, 110,3 μ g de billes enrobées de streptavidine pour SPA

à l'yttrium, 0,126 nM d'HD Oligo DR2, et, soit 0,3 µg de PPARα avec 0,5 µg de RXRα, 0,5 µg de PPARδ avec 0,5 µg de RXRα, soit 1,25 µg de PPARγ avec 3,03 µg de RXRα dans le tampon de liaison ci-dessus, plus 14 % de glycérol et 5 µg d'ADN de sperme de saumon cisailé. La liaison non spécifique est

5 déterminée en présence de 10 000 nM du composé de référence double agoniste de PPAR α/δ non marqué, pour les essais sur les récepteurs alpha et delta et le composé de référence agoniste de PPARγ pour l'essai sur les récepteurs gamma. La réaction de liaison (100 µl par puits dans une plaque de 96 puits [Costar 3632]) est incubée pendant 10 h et les désintégrations par

10 minute (dpm) comptées sur un compteur Wallac Microbeta. L'affinité de liaison au récepteur (CI₅₀) pour le composé est déterminée en ajustant une courbe de concentration-réponse à 11 points avec une équation logistique à 4 paramètres. Le K_i est déterminé à partir de la CI₅₀ en utilisant l'équation de Cheng-Prussoff et le K_d déterminé par saturation de la liaison. Pour le composé de l'exemple 1,

15 aucune liaison n'est détectée dans l'un quelconque des trois essais de liaison de PPAR avec des concentrations allant jusqu'à 10 µM. Ainsi, les essais présentés ici soutiennent que le composé de l'exemple 1 active sélectivement GPR40 tout en évitant l'activité PPAR non souhaitable. La valeur relative de CI₅₀ pour le composé d'illustration lorsqu'il est testé jusqu'à 30 µM est

20 supérieure à 10 µM pour les isoformes de PPAR, soutenant que le composé d'illustration évite l'activité PPAR tout en fournissant l'activation de GPR40 souhaitée.

Des essais fonctionnels rapporteurs de Gal4 PPARα, Gal4 PPARδ, et PPARγ sont également utilisés pour contrôler la sélectivité du composé

25 d'illustration. Des cellules CV1, qui sont dérivées du tissu rénal de singe vert d'Afrique, sont transfectées avec différents récepteurs et plasmides rapporteurs en utilisant du Fugene. Pour les essais de Gal4 PPARα et PPARδ, un plasmide rapporteur contenant cinq copies en tandem de l'élément de réponse à la protéine de transcription de levure Gal4, cloné en amont d'un gène de

30 luciférase de luciole dirigé par le promoteur tardif majeur d'adénovirus, est transfecté avec un plasmide dirigé par le virus simien 40 (SV40) exprimant de manière constitutive une protéine hybride contenant le domaine de liaison à

l'ADN de Gal4 (DBD), et la liaison au ligand soit PPAR α soit PPAR δ . Pour l'essai de PPAR γ , des plasmides codant pour PPAR γ et RXR α , tous deux dirigés par un promoteur du cytomégalo virus (CMV) sont transfectés conjointement avec un plasmide contenant de l'ADNc rapporteur de luciférase dirigé par le promoteur TK et un élément de réponse au récepteur (PPRE 2X). Les cellules sont transfectées dans des flacons de culture cellulaire T225 cm² dans du milieu DMEM avec 5 % de FBS épuisé sur du charbon. Après une nuit d'incubation, les cellules transfectées sont traitées à la trypsine ; étalées dans des plaques opaques de 96 puits (15 000 cellules/puits) dans du milieu DMEM contenant 5 % de FBS épuisé sur du charbon, incubées pendant 4 h ; et exposées à 0,17 nM jusqu'à 10 μ M de composé à tester ou de composé de référence en dilutions d'un demi log. Après 24 heures d'incubation avec le composé, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est déterminée comme une mesure de l'activation du récepteur par luminescence. Les données sont ajustées à un modèle logistique d'ajustement à quatre paramètres pour déterminer les valeurs de CE₅₀. Le pourcentage maximum de stimulation est déterminé par rapport à la stimulation maximale obtenue avec 10 μ M d'un composé de référence agoniste de PPAR approprié. Aucune activation fonctionnelle de PPAR α , PPAR δ , ou PPAR γ , n'est détectée avec le composé de l'exemple 1 quand on l'étudie jusqu'à 10 μ M dans les essais de co-transfection par PPAR (CTF)/fonctionnels spécifiques décrits ci-dessus. Ainsi, l'essai soutient que le composé d'illustration évite l'activité agoniste de PPAR, comme souhaité.

Efficacité in vivo : test intrapéritonéal de tolérance au glucose (IPGTT pour « Intraperitoneal Glucose Tolerance Test »)

Afin d'examiner la capacité du composé d'illustration à activer GPR40 *in vivo* résultant en une efficacité anti-diabétique, à savoir une réduction des taux plasmatiques de glucose, une étude par un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (ipGTT) sur 4 jours est mené à bien, et les données sont présentées pour le composé testé ci-dessous.

Des souris Balb/c (souris albinos) mâles (âgées de 8 à 9 semaines) sont logées isolément, et nourries avec un régime alimentaire pour rongeur normal et de l'eau *ad libitum*. Les animaux sont pesés ; randomisés selon le poids corporel ; et leurs poids corporels quotidiens sont enregistrés. Les animaux reçoivent une dose une fois par jour par voie orale pendant trois jours en utilisant une formulation véhicule de méthylcellulose et tween-80. La nuit qui précède le jour 4, on fait jeûner les animaux pendant la nuit. Le matin du jour 4, les animaux reçoivent par voie orale le composé ou le véhicule seul, 60 minutes avant le test de tolérance au glucose (2 g de glucose /kg, en i.p.). Les taux de glucose dans le sang sont déterminés à partir de prélèvements de sang à la queue 0, 3, 7, 15, 30, et 60 min après l'épreuve au glucose. Le profil d'excursion de la glycémie de t = 0 à t = 60 min est utilisé pour intégrer une aire sous la courbe (ASC) pour chaque traitement. Le pourcentage d'abaissement du glucose est calculé à partir des données de l'ASC du composé par rapport à l'ASC du groupe véhicule. Le composé à tester est administré par voie orale à raison de 0,3, 1,0, 3,0, 10, ou 30 mg/kg, et un témoin positif (acide 3-[4-(2-méthyl-benzyloxy)-phényl]-hex-4-ynoïque, voir WO2005086661.) est administré à 10 mg/kg. Les taux de glucose sont significativement abaissés par rapport à ceux obtenus avec le témoin véhicule au point dans le temps de 15 minutes avec les doses de 3, 10 et 30 mg/kg et aux points dans le temps de 30 et 60 minutes avec les doses de 1,0, 3,0, 10, et 30 mg/kg de l'exemple 1. Les taux de glucose sont abaissés aux points dans le temps de 15, 30, et 60 minutes pour le témoin positif. La DE₅₀ pour ce composé sur la base des ASC pour l'abaissement du glucose est de 1,0 mg/kg. Les résultats de cette étude montrent que l'activation de GPR40 par l'exemple 1 conduit à une efficacité anti-diabétique *in-vivo*.

Le composé d'illustration selon la présente invention peut être aisément formulé en compositions pharmaceutiques selon les pratiques acceptées, connues dans l'art, telles que trouvées dans « Pharmaceutical Sciences » de Remington, Gennaro, Éd., Mack Publishing Co. Easton Pa. 1990, telles que des comprimés, des gélules remplies de matière solide ou gel, des poudres, des suspensions, ou des solutions. La composition peut également comprendre un

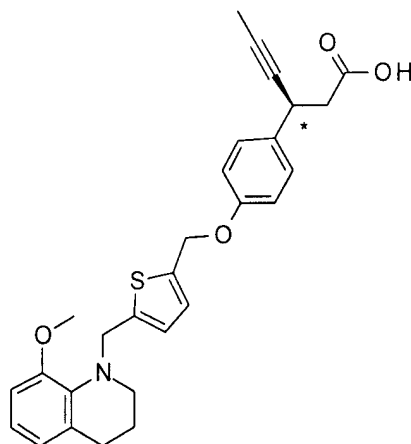
ou plusieurs supports, excipients, et diluants pharmaceutiquement acceptables. Des exemples non limitatifs de supports, d'excipients, et de diluants pharmaceutiquement acceptables qui sont appropriés pour de telles formulations comprennent les suivants : l'amidon, les sucres, le mannitol, et les dérivés de silice ; les agents liants tels que la carboxyméthylcellulose et d'autres dérivés de la cellulose, les alginates, la gélatine, et la polyvinylpyrrolidone ; des agents hydratant tels que le glycérol ; des agents délitants tels que le carbonate de calcium et le bicarbonate de sodium ; des agents pour retarder la dissolution tels que la paraffine ; des accélérateurs de résorption tels que les composés ammonium quaternaire ; des agents tensioactifs tels que l'alcool cétylique, le monostéarate de glycérol ; des supports adsorbants tels que le kaolin et la bentonite ; et des lubrifiants tels que le talc, le calcium, et le stéarate de magnésium, et les polyéthyl glycols solides.

Les compositions pharmaceutiques préférées comprennent celles formulées sous la forme d'un comprimé ou d'une gélule pour l'administration orale. Le comprimé ou la gélule peut comprendre un composé selon la présente invention en une quantité efficace pour traiter le diabète, en particulier le diabète de type deux.

La composition pharmaceutique est administrée à un patient en quantités efficaces pour traiter le diabète, plus particulièrement, le diabète de type deux. Une quantité ou une dose appropriée, efficace pour traiter un patient peut être déterminée par un fournisseur de soins de santé.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Composé qui est :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

2. Composition pharmaceutique comprenant un composé selon la
10 revendication 1 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci et au
moins un parmi un support, un diluant, ou un excipient pharmaceutiquement
acceptable.

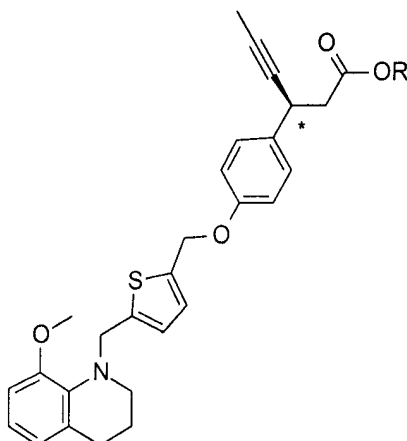
3. Composé, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, selon la
15 revendication 1 pour une utilisation en thérapie.

4. Composé, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, selon la
revendication 1 pour une utilisation dans le traitement du diabète chez un
mammifère.

20

5. Utilisation d'un composé, ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de
celui-ci, selon la revendication 1 dans la fabrication d'un médicament pour
traiter le diabète.

- 25 6. Composé selon la formule II

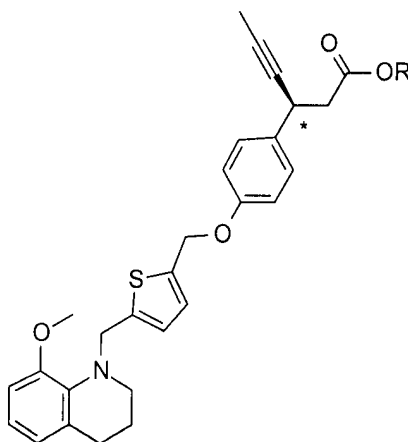


II

dans laquelle R est choisi parmi : un groupe alkyle en C₁₋₄, halogénoalkyle en C₁₋₄, cycloalkyle en C₃₋₆, alkyl en C₁₋₄-cycloalkyle en C₃₋₆, phényle, et alkylphényle en C₁₋₅.

5

7. Procédé de préparation de l'acide (3S)-3-[4-[[5-[(8-méthoxy-3,4-dihydro-2H-quinoléin-1-yl)méthyl]-2-thiényl]méthoxy]phényl]hex-4-ynoïque ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ledit procédé comprenant la déstérification d'un composé de formule II ;



II

10

où R est choisi parmi : un groupe alkyle en C₁₋₄, halogénoalkyle en C₁₋₄, cycloalkyle en C₃₋₆, alkyl en C₁₋₄-cycloalkyle en C₃₋₆, phényle, et alkylphényle en C₁₋₅ pour fournir un composé de formule I, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci

